

JOÃO BATISTA CHAVES CORRÊA

IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO PARCIAL DA  
ESTRUTURA DE UM GALACTOARABANO DO  
MATERIAL PÉCTICOS DE FRUTOS DE CAFÉ CEREJA

Tese apresentada ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

CURITIBA

1969

BC/MUFPR - MEMORIA DA UFPR  
AUTOR  
R\$ 10.00 R\$ 10.00  
Termo No. 417/03 Registro:345,530  
24/07/2003

UFPR: Sistema de Bibliotecas

## INTRODUÇÃO

As substâncias pécticas formadas por um grupo importante de polissacarídeos neutros e ácidos são encontradas nas paredes celulares e nas camadas intercelulares de todos os tecidos vegetais.

A hidrólise total dos materiais pécticos fornece a D-galactose, a L-arabinose e o ácido D-galacturônico como principais resíduos de açúcares, além da L-rhamnose, D-xilose e D-manose. As informações sobre estas substâncias vem sendo acumuladas desde 1790, quando Vauquelin (1) isolou um material gelatinoso, solúvel em água, de sucos de plantas. Mais tarde, Payen (2) e Braconnot (3) relataram a ocorrência de substâncias gelatinosas ácidas em vegetais. O interesse dos pesquisadores deste campo em conhecer a natureza química destas substâncias, era justificado não só pela abundância com que elas ocorrem no reino vegetal, constituindo-se em material de importância comercial, mas também, devido à sua correlação com a fisiologia vegetal.

Por muito tempo pensou-se que a pectina fôsse constituída de um único polímero, com uma estrutura cíclica formada por resíduos de ácido galacturônico, arabinose e galactose, até que Ehrlich e von Sommerfeld (4), e Ehrlich e Schubert (5) demonstraram que ela continha um componente polimérico formado unicamente por resíduos de arabinose. Posteriormente, investigações realizadas por Hirst e Jones (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13) em materiais pécticos de diversas fontes, conduziram à suposição de que nas substâncias pécticas ocorresse um grupo de três homopolissacarídeos bem definidos: galacturananos, arabanos e galactanos. As análises dos fragmentos obtidos de várias preparações mostraram que os galacturananos, principais componentes, eram polímeros lineares de resíduos de ácido D-galacturônico parcial ou totalmente esterificados, interligados por ligações glicosídicas  $\alpha(1-4)$ .

Os arabanos obtidos de diferentes fontes eram estruturalmente semelhantes entre si, com os resíduos de L-arabinose interligados glicosidicamente através  $\alpha(1-5)$  e  $\alpha(1-3)$ , em estrutura ramificada. Os galactanos, presentes em menor concentração, portanto, de difícil obtenção, por sua vez eram polímeros lineares de resíduos de D-galactose interligados através ligações  $\beta(1-4)$ .

No decorrer das investigações sobre a constituição química das substâncias pécticas, Miyama em 1936 (14), pesquisando os polissacarídeos presentes na semente de amendoim, comunicou o isolamento de um material contendo L-arabinose, D-galactose e ácido urônico. O referido autor imaginou que se tratava de um galactoarabano, onde os resíduos de L-arabinose estariam na forma piranosídica e que o ácido urônico presente seria um artefato consequente da oxidação da galactose durante o processo de extração alcalina. A possibilidade de isolamento de um galactoarabano como polissacarídeo definido, como imaginava Miyama, despertou enorme interesse nos pesquisadores deste campo, daquela época (15).

Entretanto, todas as posteriores tentativas de isolamento de tal polímero de sementes de amendoim, por outros autores, resultaram infrutíferas e serviram para consolidar a idéia de que galacturananos, arabanos e galactanos existiriam nas substâncias pécticas como homopolissacarídeos separados, bem definidos. Contudo, as mais recentes tentativas de precipitação destes polissacarídeos isolados de substâncias pécticas, pelo emprego de método mais adequado, têm resultado na obtenção de materiais homogêneos, tanto em eletroforese como por filtração em gel de Sephadex, cujos estudos de seus

hidrolisados parciais revelaram a presença de oligossacarídeos contendo mais de uma espécie de açúcar (16, 17). Deste modo, o polissacarídeo obtido por Andrews e col. (18), pelo tratamento da pectina de maçã com hidróxido de cálcio, a quente, indicava a presença de L-arabinose, D-galactose, L-rhamnose e ácido D-galacturônico na proporção molecular aproximada de 21:3:1:1,5, além de pequenas quantidades 2-O-metil-D-xilose, 2-O-metil-L-fucose, manose, fucose e um ácido aldobiurônico composto de ácido galacturônico e 2-O-metilxilose. A eletroforese do polissacarídeo em três diferentes tampões dava manchas que migravam para o ânodo. Para cada tampão foi obtida uma única mancha. As tentativas de fracionamento do polissacarídeo, visando um enriquecimento em arabinose, através da formação de complexo com o cobre, extração com a mistura álcool-água e precipitação com cetavlon, não surtiram os efeitos desejados. Por outro lado, os resultados encontrados por Corrêa (19), quando estudava a fração A (arabano), obtida pelo fracionamento com cetavlon dos polissacarídeos extraídos de material pectico de frutos de café cereja, foram bastante semelhantes àqueles relatados por Andrews e col. Ainda mais recentemente, Barret e Northcote (20), tentando reavaliar a composição e a natureza dos componentes da pectina de maçã, por meio do emprêgo de técnicas de fracionamento e métodos analíticos químicos e físicos mais acurados, chegaram a resultados que evidenciam a existência de heteropolissacarídeos nestas substâncias. Estes autores conseguiram o fracionamento do material pectico de maçã em um ácido pectínico puro e em um complexo neutro formado de arabano-galactano, através da precipitação do componente ácido com etanol e com cloreto de cetilpiridíneo. A análise destas frações mostrou que o ácido pectínico continha ácido galacturônico, arabinose, galactose, rhamnose, xilose e traços de outros açúcares. Após degradação por meio da reação de transeliminação (rápido aquecimento em pH neutro), o ácido pectínico deu origem a dois outros componentes, A e B, completamente separáveis por eletroforese e por filtração em gel de Sephadex. A análise destes componentes confirmou que suas moléculas eram formadas por longas cadeias de resíduos de ácido galacturônico esterificados, porém, ligados a elas encontravam-se também resíduos de açúcares neutros, principalmente de arabinofuranose, presente no componente A na proporção de 51%. Nos ácidos aldobiurônicos, obtidos por hidrólise parcial do ácido pectínico, a rhamnose, a galactose e a xilose encontravam-se ligados covalentemente à molécula, sugerindo que a ligação galacturonosil-(1-2)-rhamnose seria característica dos ácidos pectínicos em geral. O complexo neutro arabano-galactano, contendo proporções aproximadamente equimoleculares de arabinose e galactose, embora homogêneo por eletroforese em tampão borato e por filtração em gel de Sephadex, indicou a presença de pelo menos dois componentes em ultracentrifugação.

Estas investigações tiveram prosseguimento com os trabalhos de Stoddart, Barret e Northcote (21) que estudaram o material pectico de diferentes partes do sicômoro em diferentes fases do seu desenvolvimento. Eles verificaram que as composições do câmbio e do calo eram semelhantes. A análise eletroforética dos componentes da pectina dos tecidos em fase de crescimento mostrou que as preparações continham, além dos componentes neutros e fracamente ácidos (ácido pectínico), um outro fortemente ácido constituído de ácido galacturônico. O ácido pectínico obtido do sicômoro era em tudo semelhante ao da maçã.

A presença de xilose e de rhamnose nos ácidos aldobiurônicos, galacturonosil-xilose e galacturonosil(1-2)-rhamnose obtidos na hidrólise parcial do conjunto das pectinas do sicômoro sugeria que os açúcares neutros estivessem ligados às cadeias de poliuronidos destas moléculas.

Todavia, arabinogalactanos homogêneos com estruturas altamente ramificadas, têm sido isolados de imensa variedade de plantas. Em coníferas onde ocorrem

em maior quantidade no gênero *Larix*, parecem ser uma característica geral destas árvores (22), participando como componentes das hemiceluloses. Também são encontrados como constituintes de certas plantas gomosas, tanto nas resinas exudadas pelo caule (*Acácia*, *tragacanta*, etc.), como em sementes. O arabinogalactano constituinte da resina exudada pela *tragacanta* (*Astragalus* sp) foi estudado por Aspinall e Baillie (23). Estes autores, utilizando processos de metilação, degradação por hidrólise ácida fraca controlada e oxidação com periodato, obtiveram resultados que indicavam para este polissacarídeo uma estrutura altamente ramificada, composta de cadeias interiores de resíduos de D-galactopirranose, nos quais a maioria das unidades estariam mutuamente ligadas através ligações glicosídicas (1-6), e uma pequena proporção através ligações (1-3). As estas cadeias interiores estariam ligadas as ramificações exteriores, formadas por cadeias de resíduos de L-arabinofuranose interligados através ligações glicosídicas do tipo (1-2), (1-3) e (1-5). Este polissacarídeo continha ainda pequenas quantidades de ácido D-galacturônico e L-rhamnose.

Embora as estruturas químicas de fragmentos de polissacarídeos de várias fontes pécticas, gomas e mucilagens tenham sido elucidadas, existem ainda dúvidas se tais fragmentos existem realmente como polímeros individuais, ou se foram destacados da macromolécula de heteropolissacarídeo, constituída simultaneamente de cadeias de resíduos neutros e cadeias de resíduos ácidos. Isto não é improvável, desde que as ligações glicosídicas das cadeias poligalacturonosil esterificadas são muito lábeis em solução alcalina e assim, tanto as extrações alcalinas como as purificações através os processos de acetilações poderiam romper as ligações covalentes das macromoléculas de heteropolissacarídeos, dando pequenos polímeros de composições uniformes. O conhecimento da verdadeira natureza química dos polissacarídeos ácidos e neutros, componentes das pectibas, gomas e mucilagens dos tecidos vegetais, em diferentes estágios de desenvolvimento, poderá ser de grande valia na elucidação dos problemas relacionados à fisiologia de plantas. Este trabalho foi realizado com o intuito de demonstrar a presença de um heteropolissacarídeo, formado de galactose, arabinose, rhamnose e ácido galacturônico, entre os componentes neutros do material péctico de frutas de café cereja.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos de café cereja, variedade Mundo Novo 379-19, foram coletados na fazenda Seara, município de Londrina, Paraná. Após despulpagem mecânica, o epicarpo e o mesocarpo foram conservados a 0°C, usando-se o tolueno como preservativo.

### Pó-cetônico

O epicarpo e o mesocarpo (5000 g) foram triturados em liquidificador com aproximadamente 2 volumes de acetona e o homogeneizado assim obtido foi filtrado a vácuo em buchner. O resíduo, após mais duas extrações com igual volume de acetona, foi seco à temperatura ambiente em sala desumidificada (45% de umidade ambiente) e triturado em moinho Wiley. O pó cetônico foi, em seguida, extraído sucessivamente com a mistura de clorofórmio-metanol 2:1(V/V) e com n-butanol saturado com água. Cada uma destas extrações foi efetuada durante 12 horas, com agitação mecânica. Após a filtração, o resíduo foi seco à temperatura ambiente e o material assim obtido (560 g) serviu de fonte para a extração de polissacarídeos.

### Extração dos polissacarídeos

Os polissacarídeos foram extraídos a partir de 500 g de pó-cetônico com 5 litros de solução hidróxido de cálcio (25 g/1000 ml de água) em autoclave a vapor fluente, durante 12 horas. Após a filtração a vácuo em buchner, o filtrado foi acidificado com ácido acético glacial a pH 5-6 para precipitar o ácido pectico degradado (24), o qual foi eliminado por nova filtração. A solução límpida foi dialisada durante três dias contra água corrente e precipitada com 3 volumes de etanol absoluto. Depois de centrifugado a 4.000 g durante 15 minutos, o precipitado foi tratado duas vezes com acetona, seco a vácuo, obtendo-se um pó de cor acinzentada (30 g), constituído da mistura de polissacarídeos.

### Fracionamento com detergente

O produto (30 g) da extração alcalina, foi solubilizado em água e fracionado com brometo de cetiltrimetilamônio (cetavlon), em tampão borato a 1%, pH 12,5 (25, 26 e 27), obtendo-se um precipitado gelatinoso fração A. O sobrenadante foi separado através de funil separador, neutralizado com ácido acético e dialisado contra água corrente durante 3 dias e água destilada durante 1 dia. Após sucessivas precipitações com etanol e acetona foram obtidos 3,6 g de material de cor amarelo palha, que foi denominado de fração B.

### Hidrólises ácidas parciais

a) Hidrólise parcial com  $H_2SO_4$  0,01N - A fração B foi submetida à hidrólise fraca com solução de  $H_2SO_4$  0,01N (200 mg/50 ml), à temperatura de 90°C, durante 15 horas. A solução hidrolisada foi, em seguida, tratada com 4 volumes de etanol absoluto, obtendo-se um precipitado que, após sucessivas lavagens com etanol e acetona, deu 125 mg de material seco denominado de fração B<sub>1</sub>. O sobrenadante alcoólico

foi evaporado a vácuo para eliminação do álcool. A solução aquosa resultante, previamente deionizada pela passagem através de coluna de resina Amberlite IR-4B-OH<sup>-</sup>, 25-50 mesh, (Rohm Haas Company), foi concentrada a vácuo até consistência de xarope e denominada de fração S<sub>1</sub>.

b) Hidrólise parcial com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N - A fração B<sub>1</sub> foi hidrolisada com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N (100 mg/25 ml), à temperatura de 100°C, durante 15 horas. Em seguida, foi adicionado etanol absoluto (4 volumes) ao hidrolisado obtendo-se um precipitado que, depois de sucessivas lavagens com etanol e acetona, deu 40 mg de material seco, que foi denominado de fração B<sub>2</sub>. O sobrenadante alcoólico, depois de eliminado o álcool por evaporação, foi deionizado pela passagem através de coluna de resina Amberlit IR-4B-OH<sup>-</sup> e, em seguida, concentrado a vácuo (40°C), até um xarope, recebendo a denominação de fração S<sub>2</sub>.

#### Cromatografia em coluna de Sephadex

As frações B e B<sub>1</sub>, foram filtradas em uma coluna de Sephadex G-100 (Pharmacia, Uppsala). A coluna de gel de dextrano media 18 x 900 mm e foi equilibrada com solução de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05M. As soluções das frações B e B<sub>1</sub> (10 mg/ml) foram aplicadas à coluna e eluídas com solução de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05M. A velocidade de escoamento da coluna era de aproximadamente 30 ml por hora e o volume do eluato de cada tubo era de 0,5 ml. Os eluatos da coluna foram coletados em coletor Beckmann, à temperatura ambiente e os carboidratos totais determinados em cada fração cromatográfica.

#### Hidrólise ácida total

A hidrólise ácida total foi efetuada com ácido fórmico a 98% (20 mg/5 ml) em ampola selada, durante 8 horas à temperatura de 100°C. Em seguida, o material foi evaporado a vácuo até secar e novamente hidrolisado com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, à temperatura de 100°C, durante 3 horas. Após a precipitação dos íons de sulfato pela adição de solução hidróxido de bário saturada até pH 5, o material foi centrifugado e o sobrenadante deionizado pela passagem através de coluna de Dowex 50W-X8, 200-400 mesh, H<sup>+</sup> (Dow Chemical Co), conjugada a uma outra de Amberlite IR-4B, 25-50 mesh, OH<sup>-</sup> (Rohm Haas Company).

#### Separação dos açúcares ácidos

Os ácidos urônicos foram separados dos açúcares neutros por meio de uma coluna de Dowex 1-x8, 200-400 mesh, forma acetato, sendo os açúcares neutros eluídos com água e os açúcares ácidos com solução de ácido fórmico 2N.

#### Fracionamento em coluna de carvão-celite

A fração S<sub>2</sub>, obtida da hidrólise parcial da fração B<sub>1</sub> com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N, foi fracionada em uma coluna de carvão-celite (23). Os monossacarídeos foram eluídos com água e desprezados. Os dissacarídeos e os trissacarídeos, eluídos respectivamente com etanol a 5% e a 15%, foram recolhidos e suas soluções concentradas a vácuo.

#### Cromatografia em papel

A cromatografia analítica, descendente, dos açúcares neutros foi efetuada em papel Whatman nº 4 e a dos açúcares ácidos (ácidos urônicos) em papel Whatman nº 1. A cromatografia preparativa, descendente, dos oligossacarídeos foi realizada em papel Whatman 3MM, previamente lavado.

Foram utilizados os seguintes sistemas de solventes (todos V/V):

a) benzeno: n-butanol: piridina: água, 1:5:3:3, para açúcares neutros, dissacarídeos e trissacarídeos (29);

b) acetona: etanol: isopropanol: tampão borato 0,05M, pH 10, 3:1:1:2, para açúcares ácidos (ácidos urônicos (30)).

As manchas foram visualizadas com cloridrato de p-anisidina (31) e com cloreto de 2,3,5,- trifeniltetrazólio (32).

#### Eletroforese em papel

A eletroforese das frações B e B<sub>1</sub> foi realizada em papel Whatman nº 1, durante 2 horas a 20 volts/cm, em tampão borato 0,05M pH 9,2 (33). A eletroforese dos dissacarídeos, depois da redução com boridreto de sódio, foi efetuada em papel Whatman nº 1, em tampão molibdato 0,1M pH 5, durante 2 horas a 20 volts/cm (34), usando-se o celobitol, e o gentiobitol como referência. As manchas foram visualizadas pelo nitrato de prata alcalino (35).

#### Cromatografia em fase gasosa dos alditóis acetilados

Os açúcares livres provenientes das hidrólises ácidas totais das frações B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, S<sub>1</sub> e dos oligossacarídeos da fração S<sub>2</sub>, bem como os produtos da degradação de Smith, foram reduzidos com boridreto de sódio, durante 12 horas à temperatura ambiente. Após a decomposição do excesso de boridreto pela adição de ácido acético e eliminação do borato resultante por sucessivas evaporações (8 vezes) com metanol, os alditóis foram acetilados com anidrido acético e acetato de sódio anidro a 120°C, durante 3 horas (36).

A análise por cromatografia em fase gasosa (termocondutividade) foi realizada em instrumento F & M - Modelo 810-19, usando-se hélio como gás de arraste (60 ml/min), e coluna (3 x 1800) de 5% de succinato de dietilenoglicol em chromosorb W (19). A temperatura da coluna (isotérmica) era de 200°C para os alditóis acetilados das frações B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, S<sub>1</sub> e oligossacarídeos da fração S<sub>2</sub>, e de 180°C para os alditóis acetilados das degradações de Smith. A mistura de padrões de alditóis acetilados (glicerol, eritritol, rhamnitol, arabinitol, xilitol, manitol e dulcitol) foi cromatografada em idênticas condições.

#### Oxidação com periodato

As frações B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (50 mg) foram oxidadas com metaperiodato de sódio (25 ml de solução 0,05M final), na obscuridade e à temperatura de 0-2°C, durante 72 horas. Os moles de periodato consumidos e os moles de ácido fórmico liberados no final da oxidação (37, 38) foram expressos por mol de resíduo médio de açúcar anidro. Para se calcular o resíduo médio de açúcar anidro, foi levada em consideração as proporções molares dos açúcares presentes nas diferentes frações. Para a verificação da presença de formaldeído liberado na oxidação com periodato foi utilizada a reação com o ácido cromatográfico (39).



Os dissacarídeos D-3, D-4 e D-5 foram reduzidos com boridreto de sódio, os ions de sódio removidos pela passagem através de coluna de resina Dowex 50W-X8 (200-400 mesh, H+) e os ions de borato por sucessivas evaporações com metanol (40). Em seguida, os dissacarídeos reduzidos foram oxidados com metaperiodato de sódio 0,185M, na obscuridade, à temperatura de 0-29°C. Após 48 horas de oxidação o ácido fórmico liberado foi titulado com NaOH 0,01N, usando-se o bromocresol púrpura 0,2% em etanol como indicador (41).

#### Degradação de Smith

As frações B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, trissacarídeo T-4 e dissacarídeo D-4, depois de oxidados com o metaperiodato de sódio, foram submetidos a degradação de Smith (42,43). Após a degradação o material foi reduzido com boridreto de sódio e os aldifóis acetilados foram analisados por cromatografia gasosa, conforme as técnicas anteriormente descritas.

#### Métodos analíticos

A galactose e os dissacarídeos foram analisados pela galactose oxidase (44). Os carboidratos totais foram determinados pelo método de fenol-ácido sulfúrico (45). Para a determinação dos ácidos urônicos foi utilizado o método do carbazol (46). As rotações óticas específicas foram determinadas em soluções aquosas (0,5-1 g/100 ml), empregando polarímetro Schmit Haench com lâmpada de sódio. Os espectros infravermelhos das frações B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, em emulsão de nujol, foram obtidos em aparelho Beckmann IR-3 Infrared Spectrophotometer, linear em número de onda. O nitrogênio total foi determinado pelo processo do micro-Kjeldahl (47) e o sulfato pelo método da benzidina (48).

## RESULTADOS

O material polissacarídico, de cor parda, contendo 1,013% de N total e 0,034% de sulfato, extraído com solução de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a quente do material péctico do epicarpo e mesocarpo dos frutos de café cerejeira, forneceu por fracionamento com cetavlon e tampão borato, pH 12,5, duas frações polissacarídicas, Fig. 1. A fração A (83%), já estudada anteriormente (19) e fração B (12%), de cor amarelo palha,  $[\alpha]_D^{20} + 5$  (água), contendo 0,15% de N total e 0,034% de sulfato. A análise cromatográfica em papel dos açúcares neutros obtidos pela hidrólise ácida total da fração B indicou a presença de arabinose, galactose, rhamnose e xilose conforme mostra a Fig. 2. A análise dos açúcares ácidos indicou a presença de ácido galacturônico, conforme Fig. 3. A relação quantitativa correspondente a aproximadamente 47% de arabinose, 34% de galactose, 8,5% de rhamnose e 10% de ácido galacturônico, tabela I, foi obtida por intermédio da cromatografia em fase gasosa de seus alditóis acetilados, Fig. 4.

A fração B, submetida a eletroforese em papel, tampão borato pH 9,2, mostrou ser heterogênea, tendo sido separada por filtração em coluna de Sephadex G-100 em duas frações polissacarídicas, F-I e F-II, conforme demonstra a Fig. 5. Estas duas frações foram analisadas separadamente por cromatografia em papel, revelando manchas que migravam como arabinose, ácido galacturônico e vestígios de rhamnose para a fração F-I, e galactose, arabinose, rhamnose e ácido galacturônico para a fração F-II, como indica a Fig. 6.

A fração  $B_1$  (62,5%),  $[\alpha]_D^{20} + 23$  (água), correspondente ao precipitado etanólico do hidrolisado parcial da fração B com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01N, era homogênea em eletroforese em papel e por filtração em coluna de gel de dextrano (Sephadex G-100), como mostra a Fig. 7. A relação quantitativa, aproximada, dos açúcares presentes na fração  $B_1$ , 47,5% de galactose, 41% de arabinose, 11% de ácido galacturônico e vestígios de rhamnose, conforme mostra a tabela I, foi obtida através da cromatografia em fase gasosa dos correspondentes alditóis acetilados, Fig. 8.

A fração  $S_1$  (37,5%), sobrenadante da precipitação etanólica do hidrolisado parcial da fração B com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01N, mostrou pela análise cromatográfica em fase gasosa, Fig. 9, que era composta de aproximadamente 95% de arabinose, 3% de galactose e 2% de rhamnose, conforme indica a tabela I.

A fração  $B_2$  (40%),  $[\alpha]_D^{20} + 27$  (água), equivalente ao precipitado etanólico do hidrolisado parcial da fração  $B_1$  com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1N, indicou pela análise cromatográfica em fase gasosa, Fig. 10, que continha aproximadamente 96% de galactose, 3,5% de ácido galacturônico e vestígios de rhamnose e arabinose, de acordo com a tabela I.

A fração  $S_2$  (60%), contendo a mistura de monossacarídeos e oligossacarídeos, foi cromatografada em uma coluna de carvão-celite. Os monossacarídeos eluídos com água foram desprezados. Os dissacarídeos e os trissacarídeos, depois de eluídos respectivamente com etanol a 5% e 15%, foram cromatografados em papel preparativo Whatman 3 MM no sistema de solventes a. Dos cromatogramas correspondentes, foram cortadas tiras de aproximadamente 1 cm de largura para a visualização das manchas, empregando-se o cloridrato de p-anisidina e o cloreto de 2, 3, 5-trifeniltetrazólio como reveladores dos dissacarídeos e cloridrato de p-anisidina para os trissacarídeos.

Através do processo de revelação com o cloridrato de p-anisidina, foi constatada a presença de cinco diferentes dissacarídeos, conforme mostra a Fig. 11, denominados de D-1, D-2, D-3, D-4 e D-5. As manchas dos dissacarídeos D-1, D-2 e D-3 eram de coloração amarela, ao passo que a do dissacarídeo D-5 era colorida de vermelho vivo. Por outro lado, a mancha do dissacarídeo D-4 apresentou-se com duas zonas de coloração diferentes, uma amarela e outra vermelho vivo. A revelação destes mesmos dissacarídeos com o cloreto de 2, 3, 5-trifeniltetrazólio confirmou a presença dos dissacarídeos D-1, D-3, D-4 e D-5, com manchas coloridas de vermelho intenso, porém, não revelou o dissacarídeo D-2, conforme mostra a Fig. 12.

No cromatograma indicado pela Fig. 13, foram identificados quatro trissacarídeos, denominados de T-1, T-2, T-3 e T-4, sendo que apenas o último era o constituinte mais apreciável.

Todos os dissacarídeos, e ainda o trissacarídeo T-4, foram eluídos com água de seus respectivos cromatogramas preparativos, a fim de serem analisados separadamente. Os demais trissacarídeos não foram eluídos por se apresentarem em concentrações insignificantes.

A tabela II demonstra a relação quantitativa dos dissacarídeos eluídos. Os açúcares componentes destes dissacarídeos foram identificados pela cromatografia em papel, conforme mostra a Fig. 14. Nesta cromatografia pode-se notar que os componentes do dissacarídeo D-1 migraram como ácido galacturônico e galactose; os do dissacarídeo D-2, como ácido galacturônico e rhamnose; os do dissacarídeo D-3 como galactose apenas; os do dissacarídeo D-4, como arabinose e galactose; os do dissacarídeo D-5 também como arabinose e galactose. Por outro lado, as presenças destes componentes nos dissacarídeos D-3, D-4 e D-5, foram confirmadas pela cromatografia gasosa dos alditóis acetilados de seus hidrolisados ácidos, que também indicaram suas relações quantitativas, conforme mostram as Fig. 15, Fig. 16 e Fig. 17, respectivamente. Nestes gráficos pode-se notar que os picos correspondentes a arabinose e galactose do dissacarídeo D-5 aparecem na relação de 1:1, enquanto que para o dissacarídeo D-4 estes mesmos picos se apresentam na relação de aproximadamente 1:3.

A cromatografia em fase gasosa dos alditóis acetilados do hidrolisado ácido do trissacarídeo T-4, indicou que este oligossacarídeo era formado de arabinose e galactose na relação molar de 1:2, como demonstra a Fig. 18.

Os resultados obtidos na análise dos dissacarídeos intactos pela galactose oxidase, relacionados na tabela III, mostraram que apenas o dissacarídeo D-4 apresentava um valor de D-galactose de aproximadamente 50% do carboidrato total deste dissacarídeo.

Os dissacarídeos D-1, D-2, D-3, D-4 e D-5, previamente reduzidos com boridreto de sódio, migraram em eletroforese em papel, tampão molibdato de sódio 0,1N pH 5, conforme mostra a Fig. 19, com os mobilidades relativas a gentiobiitol e celobiitol, indicados na tabela IV.

Os valores obtidos para o ácido fórmico liberado na oxidação com o metaperiodato de sódio dos dissacarídeos reduzidos com boridreto de sódio estão relacionados na tabela V.

Os resultados da oxidação pelo metaperiodato de sódio das frações B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, acham-se expressos na tabela VI. Não se verificou liberação do formaldeído

nestas oxidações, uma vez que a reação com o ácido cromotrópico resultou negativa.

A degradação de Smith aplicada às frações B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, resultou na formação de vários produtos. Estes produtos foram analisados por cromatografia em fase gasosa na forma de seus alditóis acetilados, constatando-se a presença do glicerol, vestígios de eritritol e dos polióis correspondentes à rhamnose, à arabinose e à galactose para a degradação da fração B<sub>1</sub>, Fig. 20, e do glicerol, vestígios de eritritol e rhamnitol para a degradação da fração B<sub>2</sub>, Fig. 21. Por outro lado, não foi possível a identificação de um pico que aparece em ambas as degradações com retenção entre eritritol e rhamnitol. Adicionalmente, foram feitas também as degradações de Smith do dissacarídeo D-4 e trissacarídeo T-4. Os produtos resultantes foram analisados da mesma forma anterior e, em ambos os casos, verificou-se a formação de glicerol e do mesmo produto não identificado nas degradações de Smith, das frações B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, como mostram as Fig. 22 e Fig. 23.

Os espectros infravermelhos das frações B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, examinados na região de 1000-700 cm<sup>-1</sup>, mostraram uma banda em 890 cm<sup>-1</sup>, de moderada intensidade.

TABELA I

Composição dos carboidratos das frações <sup>+</sup> B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e S<sub>1</sub>

Fração	Componentes %				
	Arabinose	Galactose	Rhamnose	Xilose	Ácido galacturônico <sup>++</sup>
B	47,00	34,00	8,50	vest.	10,00
B <sub>1</sub>	41,00	47,5	vest.	-	11,00
B <sub>2</sub>	vest.	96,00	vest.	-	3,5
S <sub>1</sub>	95,00	3,00	2,00	-	-

+ Calculados pela integração das áreas dos picos obtidos na cromatografia gasosa dos alditóis acetilados.

++ Obtidos através da dosagem pelo método do carbazol.

TABELA II

DISSACARÍDEOS OBTIDOS DA HIDRÓLISE PARCIAL DA FRAÇÃO B<sub>1</sub>

Dissacarídeo	Carboidrato total (mg)	%	Componentes
D-1	0,385	4,03	Ác. galacturônico-galactose
D-2	1,265	13,35	Ác. galacturônico-rhamnose
D-3	0,375	9,30	Galactose-galactose
D-4	3,000	31,80	Galactose-arabinose
D-5	3,914	41,50	Galactose-arabinose

T A B E L A   III

DETERMINAÇÃO DA D-GALACTOSE PELA GALACTOSE OXIDASE NOS DISSACARÍDEOS D-1, D-3, D-4 e D-5

Dissacarídeo	Amostra mg	D-galactose mg	D-galactose %
D-1	0,192	-	-
D-3	0,437	0,225	51
D-4	1,500	0,154	10
D-5	1,340	0,035	2,6

T A B E L A   IV

MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DOS DISSACARÍDEOS EM PAPEL TAMPÃO MOLIBDATO DE SÓDIO 0,1M, pH 5

Dissacarídeo	Mg <sup>+</sup>	Mc <sup>+</sup>
D-1	0,750	1,625
D-2	0,750	1,625
D-3	1,000	2,160
D-4	0,680	1,470
D-5	0,157	0,340

+ Mobilidades relativas a gentiobiitol e celobiitol.

T A B E L A   V

ÁCIDO FÓRMICO LIBERADO NA OXIDAÇÃO DOS DISSACARÍDEOS ALDITÓIS  
COM METAPERIODATO DE SÓDIO

Dissacarídeo	Amostra (mg)	NaOH 0,01N gasto (ml)	Ácido fórmico liberado (moles)
D-1	0,044	0,048	3,73
D-2	0,053	0,153	9,72
D-3	0,068	0,081	4,28
D-4	0,217	0,440	7,30
D-5	0,439	0,306	5,50

T A B E L A   VI

CONSUMO DE PERIODATO E ÁCIDO FÓRMICO LIBERADO NAS FRAÇÕES B<sub>1</sub> E  
B<sub>2</sub>

Fração	Amostra (mg)	Moles de periodato por mol de resíduo de açúcar anidro <sup>+</sup>	Moles de ácido fórmico por mol de resíduo de açúcar anidro <sup>+</sup>
B <sub>1</sub>	40	0,680	0,260
B <sub>2</sub>	22,5	1,47	0,716

+ Valor médio de resíduo calculado em função das proporções molares dos açúcares presentes em cada fração de polissacarídeo.

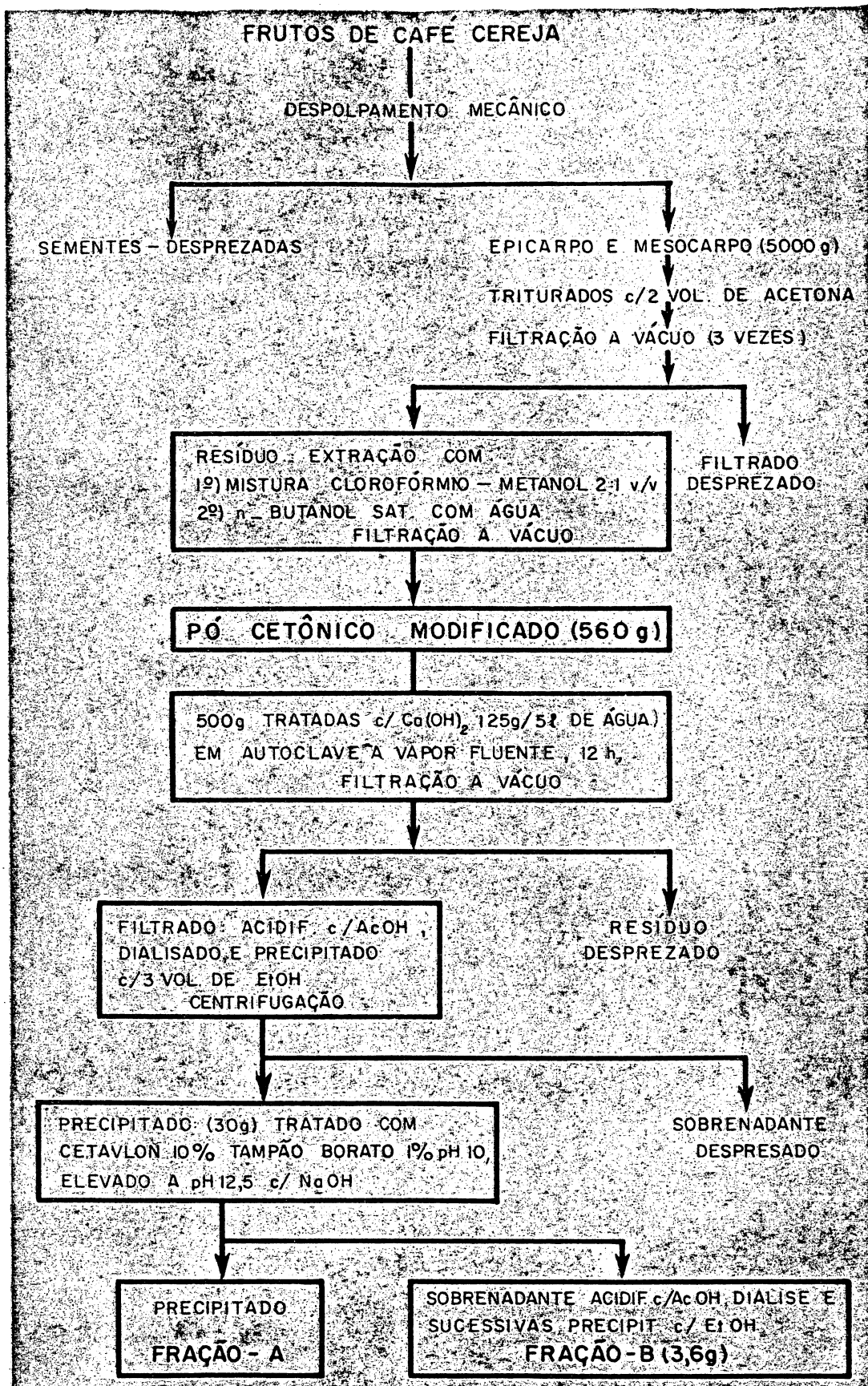


Fig. 1 - Esquema de extração e fracionamento dos polissacarídeos neutros do material péctico dos frutos de café cereja-



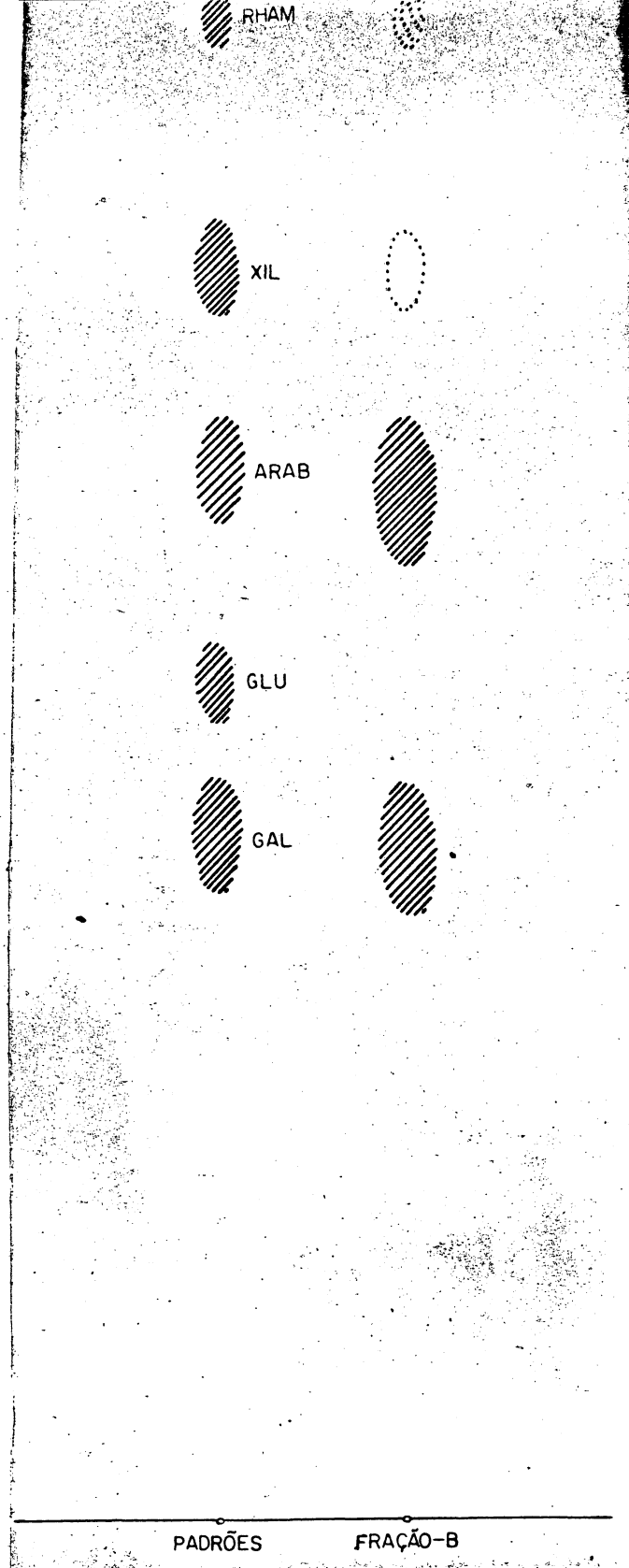


Fig. 2 - Cromatografia em papel Whatman nº 4 (descendente) do hidrolisado ácido da fração B.

Solvente: benzeno; n-butanol; piridina; água, 1:5:3:3

Revelador: cloridrato de p-anisidina.

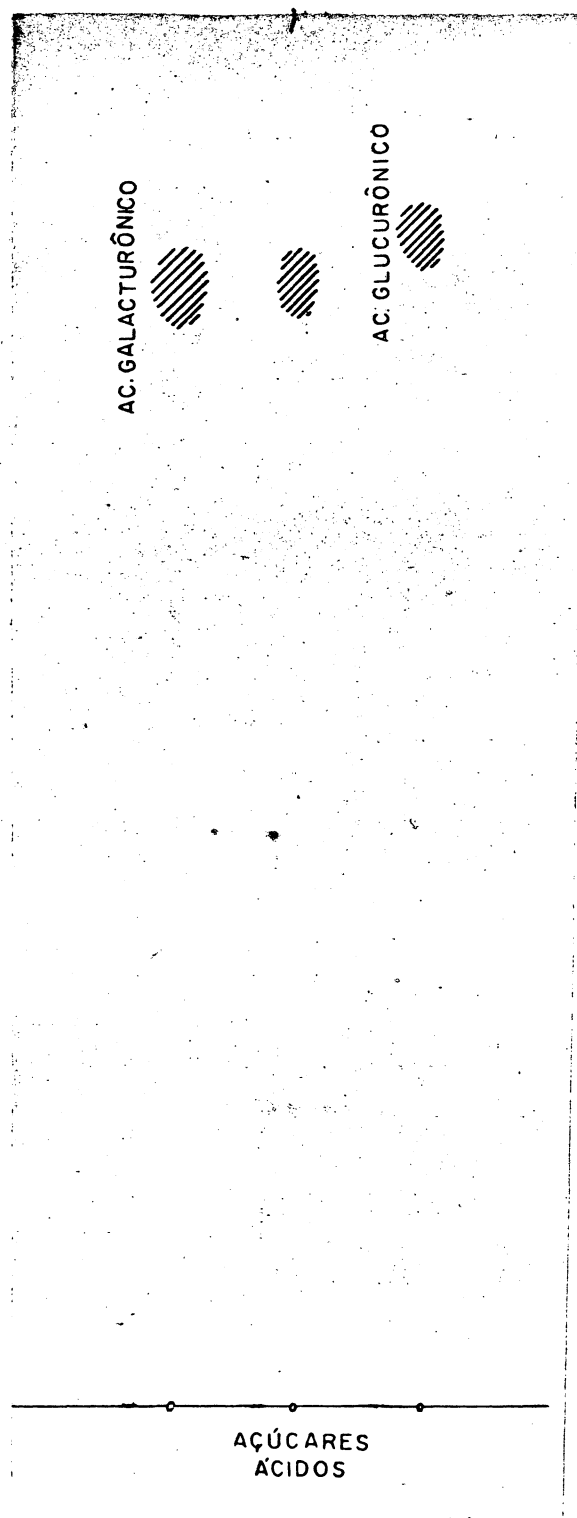


Fig. 3 - Cromatografia em papel Whatman nº1 (descendente) dos açúcares ácidos (ácidos urônicos) do hidrolisado ácido total da fração B.

Solvente: acetona; etanol; isopropanol; tampão borato 0,05M pH 10, 3:1:1:2,

Revelador: cloridrato de p-anisidina.

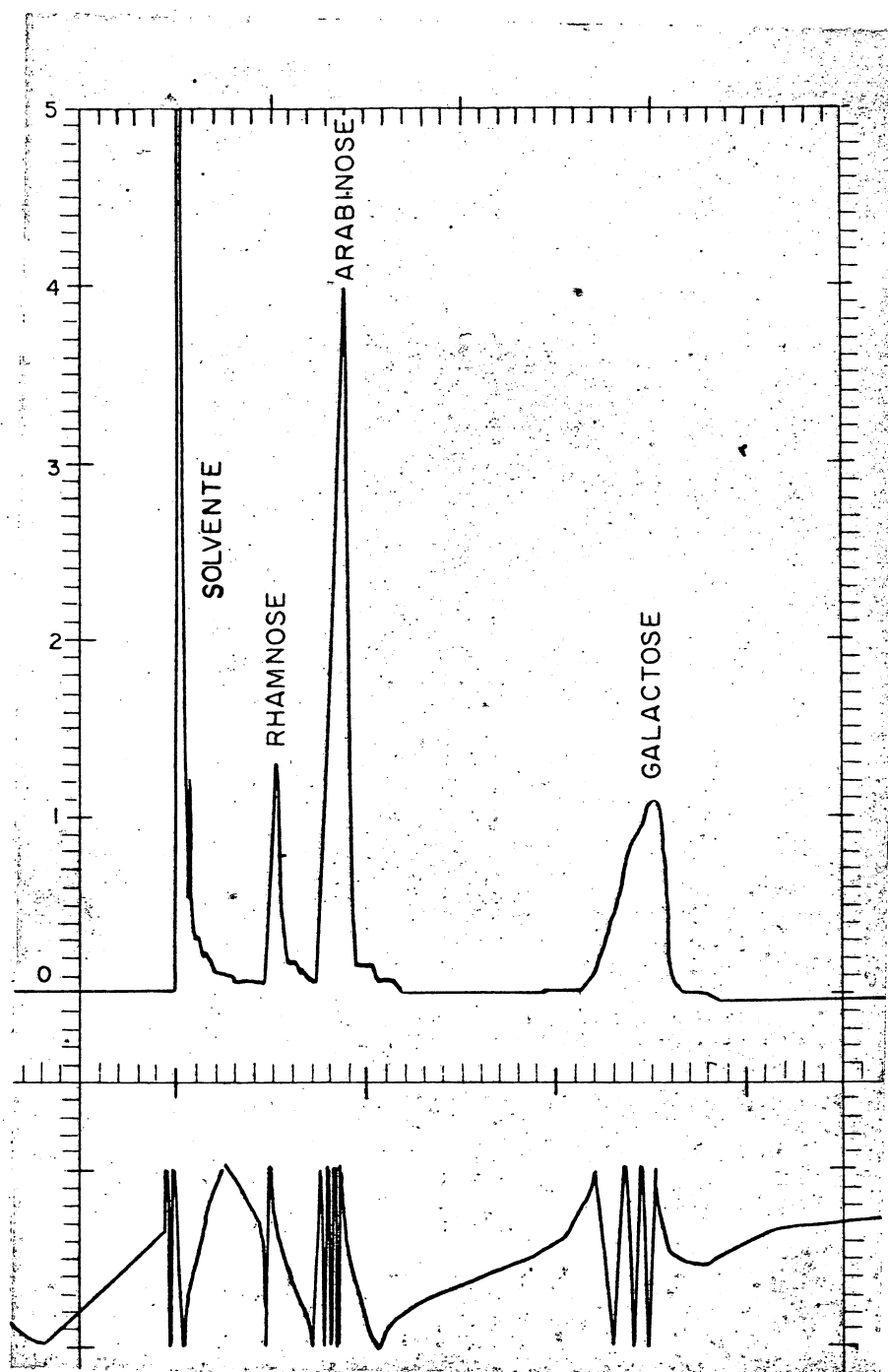


Fig. 4 - Cromatografia em fase gasosa (termocondutiva) dos alditóis acetilados do hidrolisado ácido da fração B, dissolvidos em clorofórmio. Instrumento F & M - Modelo 310-19 (F & M Scientific Co), coluna (3x1800 mm) de 5% de DEGS (succinato de dietilenoglicol) em chromosorb W. Temperatura da coluna (isotérmica) de 200°C e fluxo do gás de arraste (hélio) de 60 ml/min.

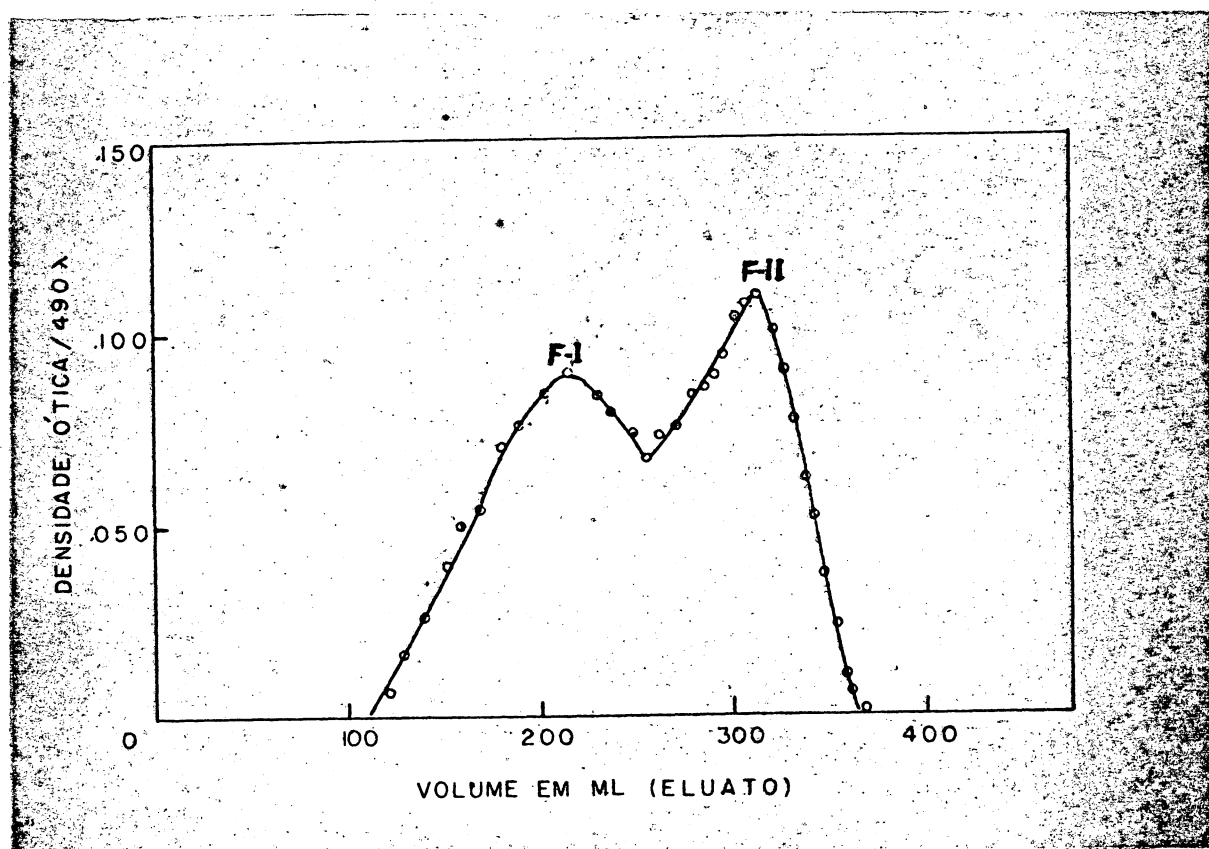


Fig. 5 - Cromatografia em Sephadex G-100 da fração B. A coluna de gel de dextrano (18 x 900 mm) foi previamente equilibrada com o líquido eluente ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,05M). As frações de 0,5 ml foram coletadas em coletor de frações Beckmann com a velocidade de escoamento de 30 ml/hora e analisadas pelo método de fenol-ácido sulfúrico.

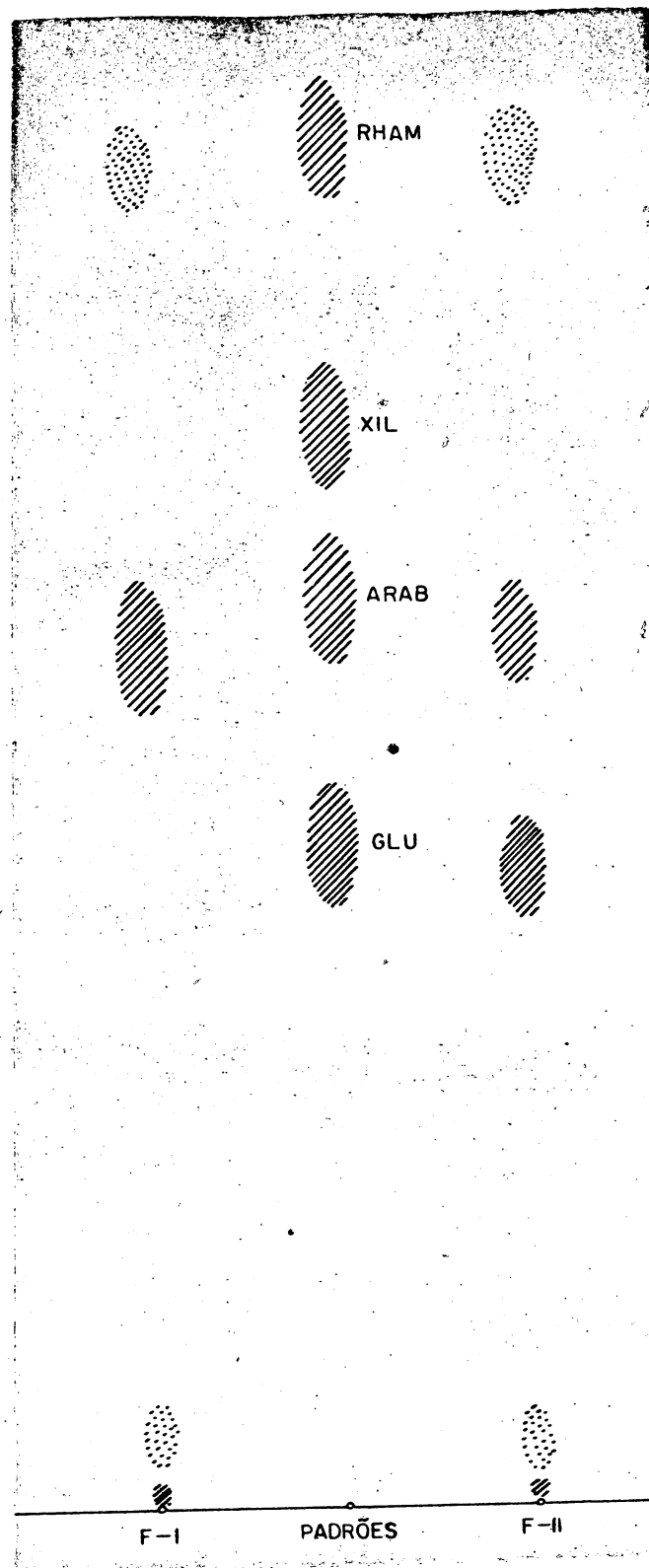


Fig. 6 - Cromatografia em papel Whatman nº 4 (descendente) dos hidrolisados ácidos totais das frações F-I e F-II.  
Solvente: benzeno; n-butanol; piridina; água, 1:5:3:3.

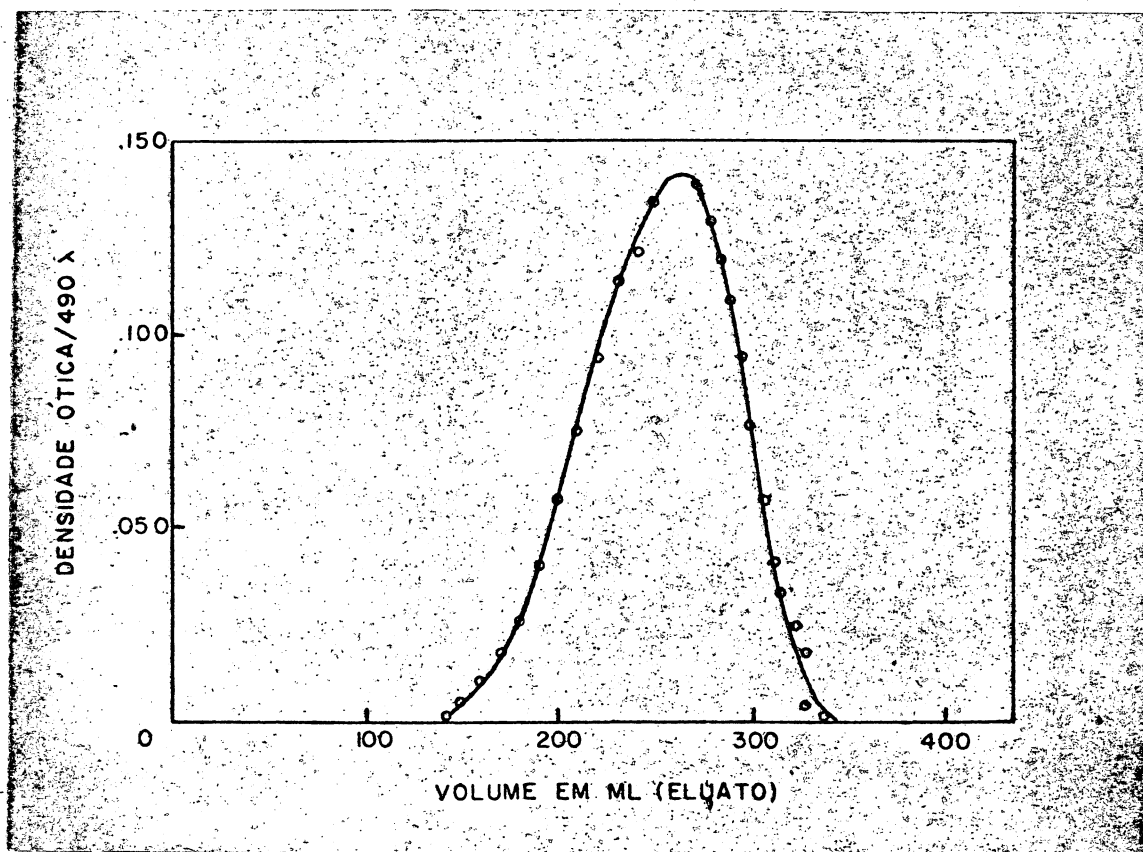


Fig. 7 - Cromatografia em Sephadex G-100 da fração B<sub>1</sub>. A coluna de gel de dextrano (18 x 900 mm) foi previamente equilibrada com o líquido eluente ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,05M). As frações de 0,5 ml foram coletadas em coletor de frações Beckmann com a velocidade de escoamento de 30 ml/hora e analisadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico.

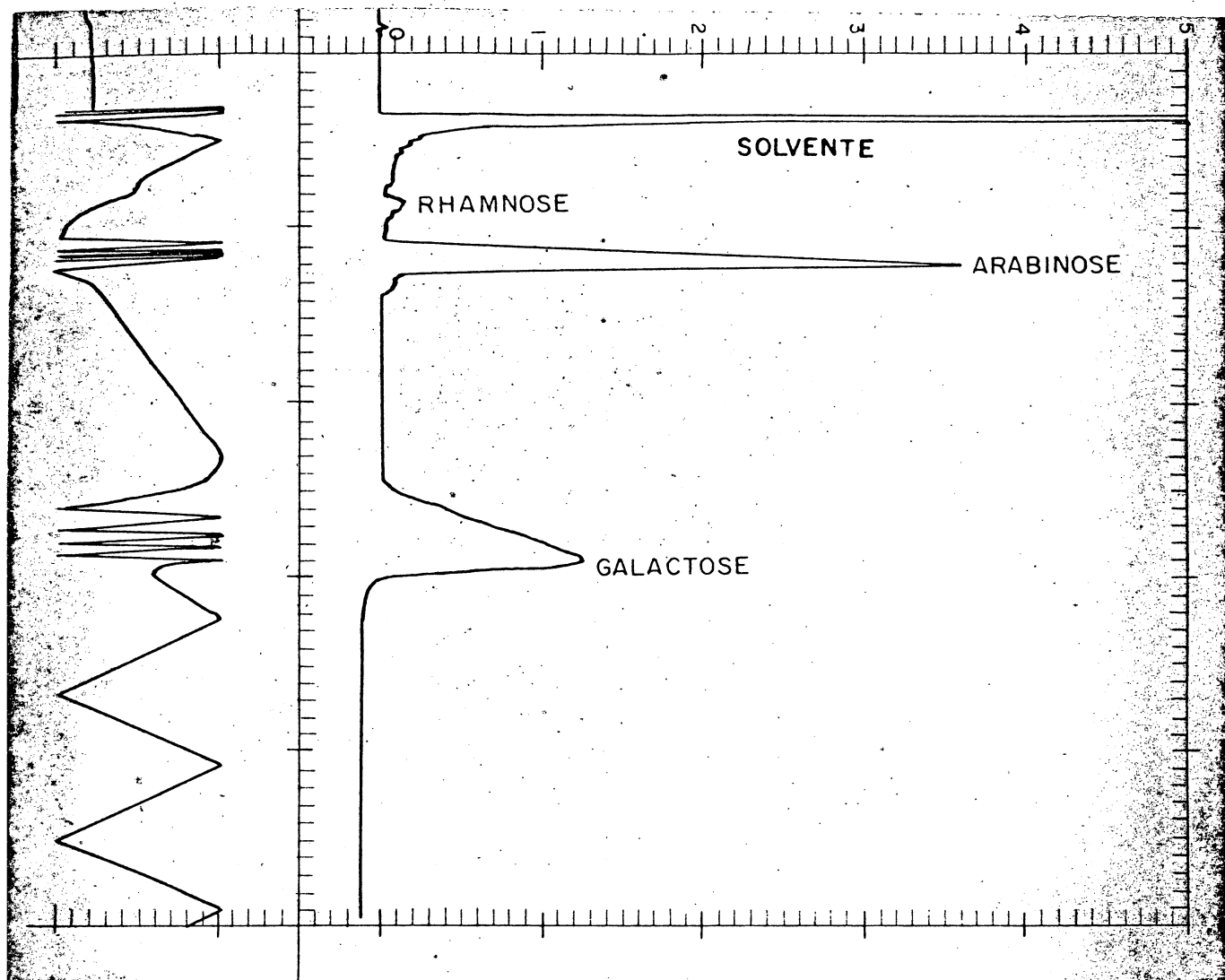


Fig. 8 - Cromatografia em fase gasosa (termocondutiva) dos alditóis acetilados do hidrolisado ácido da fração B<sub>1</sub>, dissolvidos em clorofórmio. Instrumento F & M - Modelo 310-19 (F & M Scientific Co), coluna (3 x 1800 mm) de 5% de DEGS (succinato de dietilenoglicol) em chromosorb W. Temperatura da coluna (isotérmica) de 200°C e fluxo do gás de arraste (hélio) de 60 ml/min.

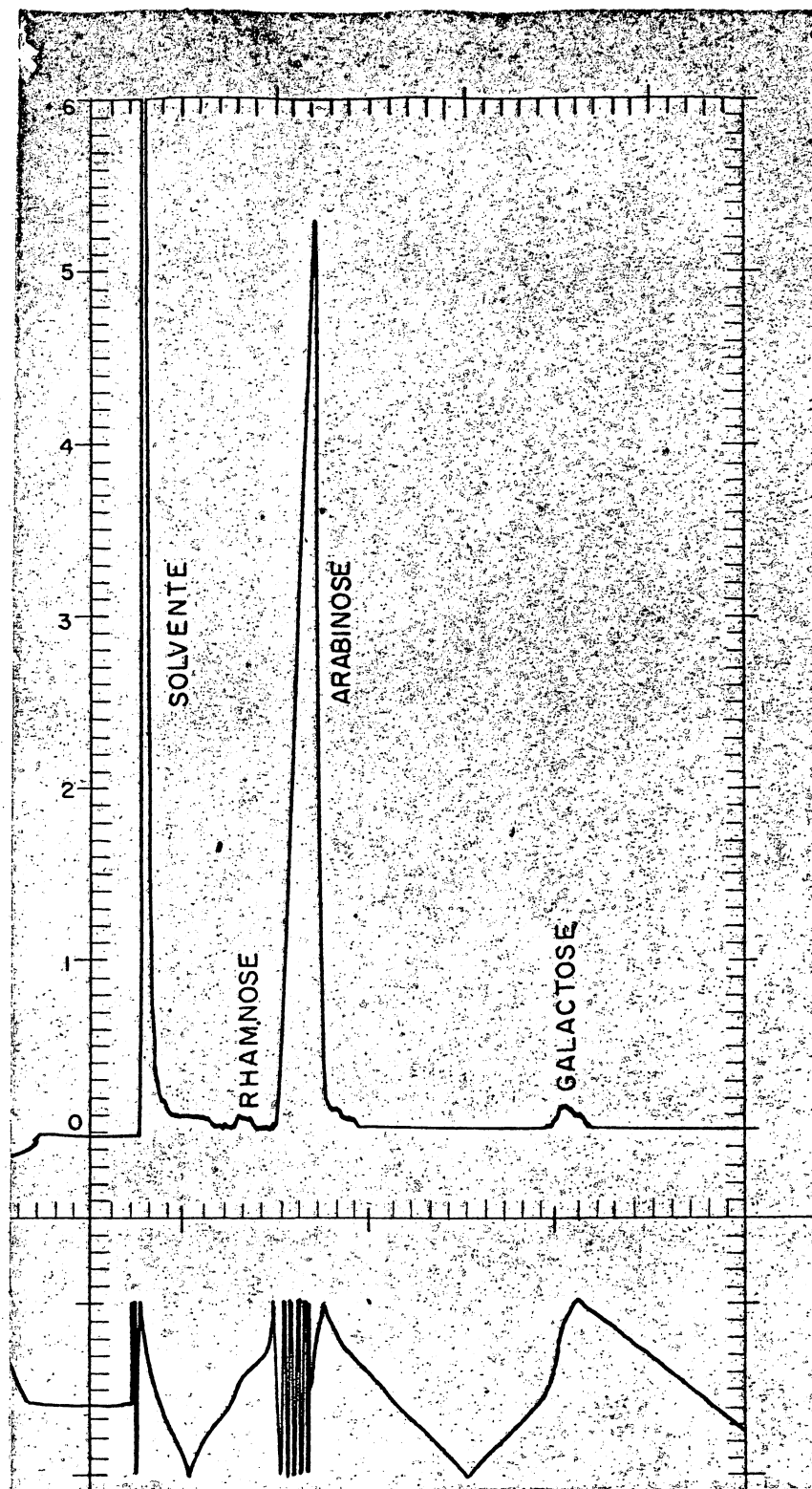


Fig. 9 - Cromatografia em fase gasosa (termocondutiva) dos alditóis acetilados do hidrolisado ácido da fração  $S_1$ , dissolvidos em clorofórmio. Instrumento F & M - Modelo 810-19 (F & M Scientific Co), coluna (3 x 1300 mm) de 5% de DEGS (succinato de dietilenoglicol) em chromosorb W. Temperatura da coluna (isotérmica) de 200°C e fluxo do gás de arraste (hélio) de 50 ml/min.



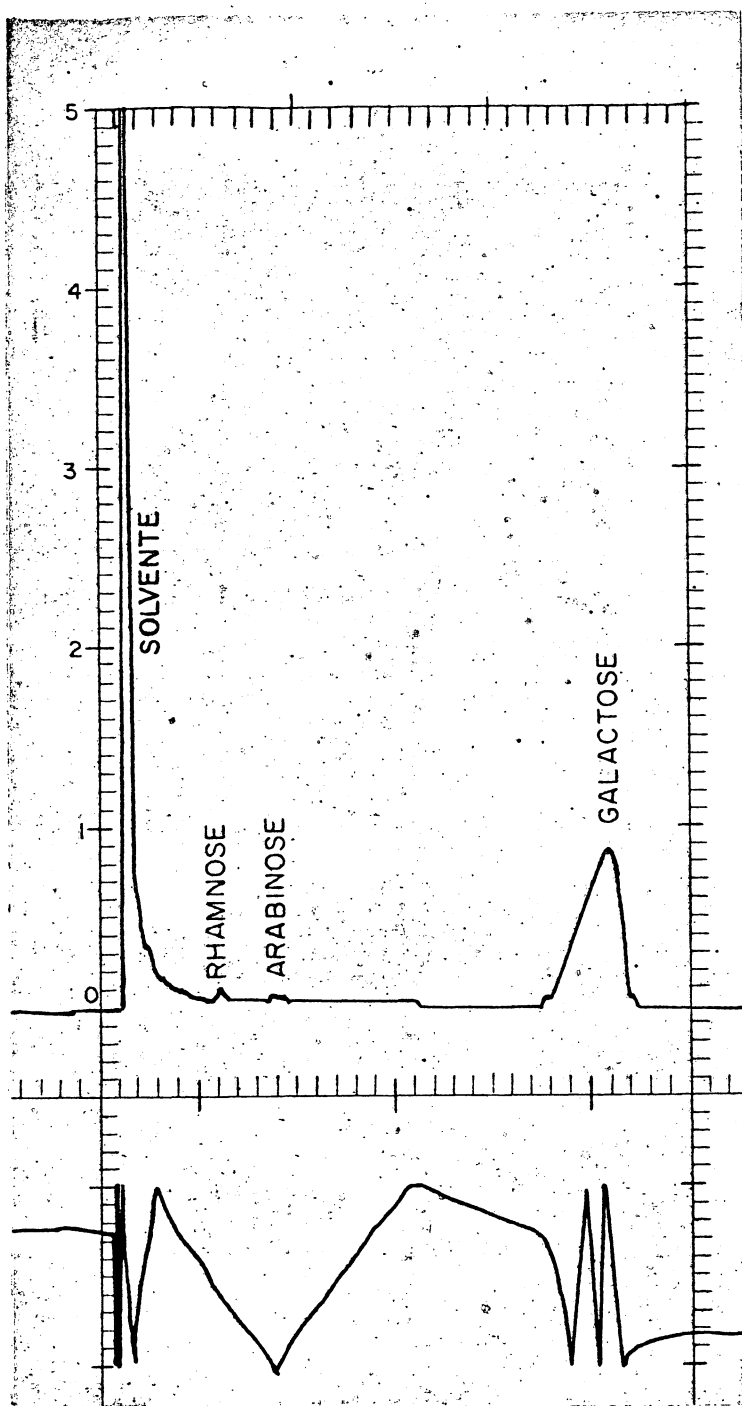


Fig. 10 - Cromatografia em fase gasosa (termocondutiva) dos alditóis acetilados do hidrolisado ácido da fração B<sub>2</sub>, dissolvidos em clorofórmio. Instrumento F & M - Modelo 310-19 (F & M Scientific Co), coluna (3 x 1800 mm) de 5% de DEGS (succinato de dietilenoglicol) em chromosorb W. Temperatura da coluna (isotérmica) de 200°C e fluxo do gás de arraste (hélio) de 60 ml/min.

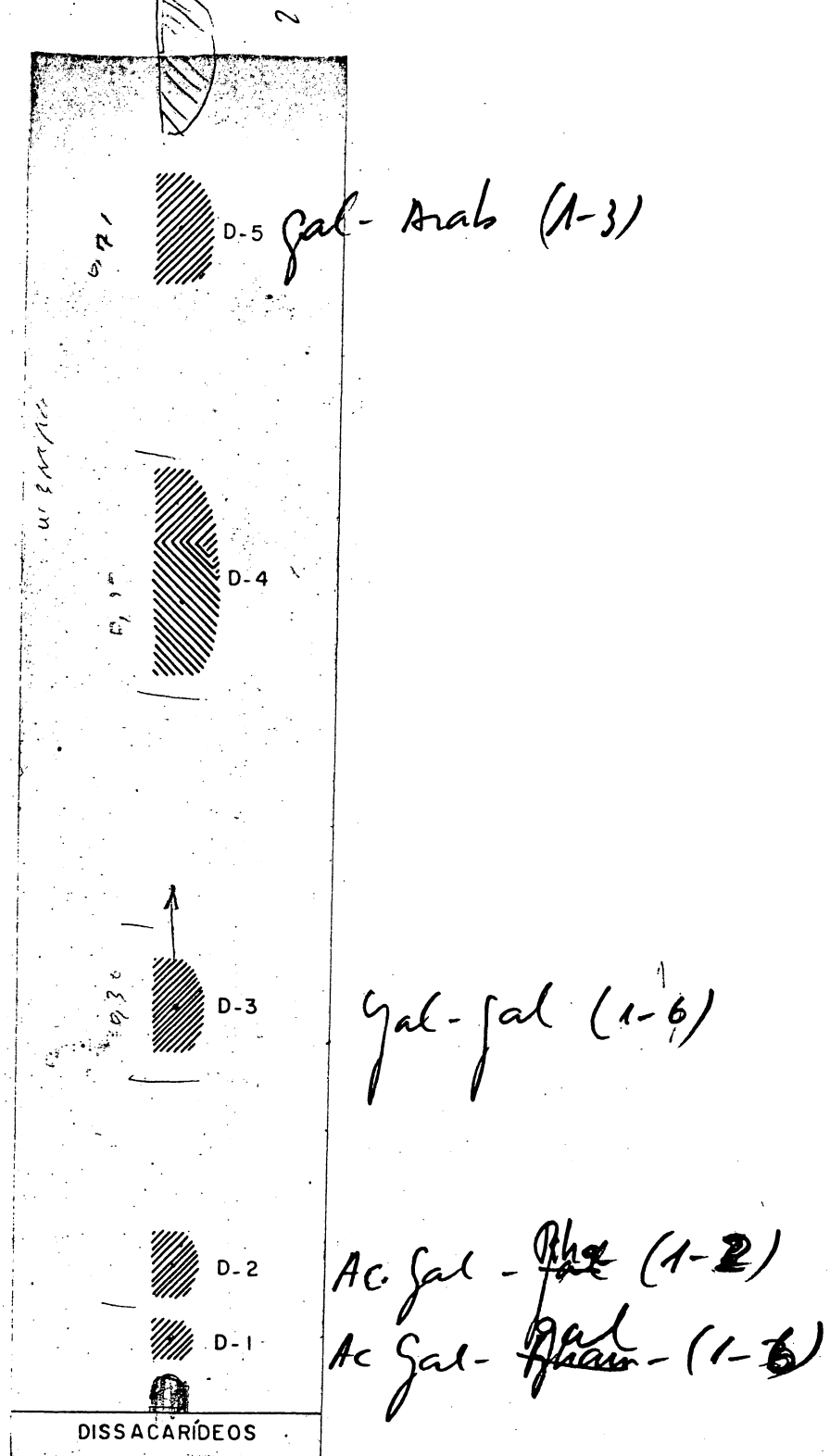


Fig. 11 - Cromatografia em papel Whatman nº 3 MM (descendente) dos dissacarídeos resultantes da hidrólise parcial da fração B<sub>1</sub> com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N e separados da fração S<sub>2</sub> por intermédio de uma coluna de carvão-celite.

Solvente: benzeno; n-butanol; piridina; água, 1:5:3:3.

Revelador: cloridrato de p-anisidina.

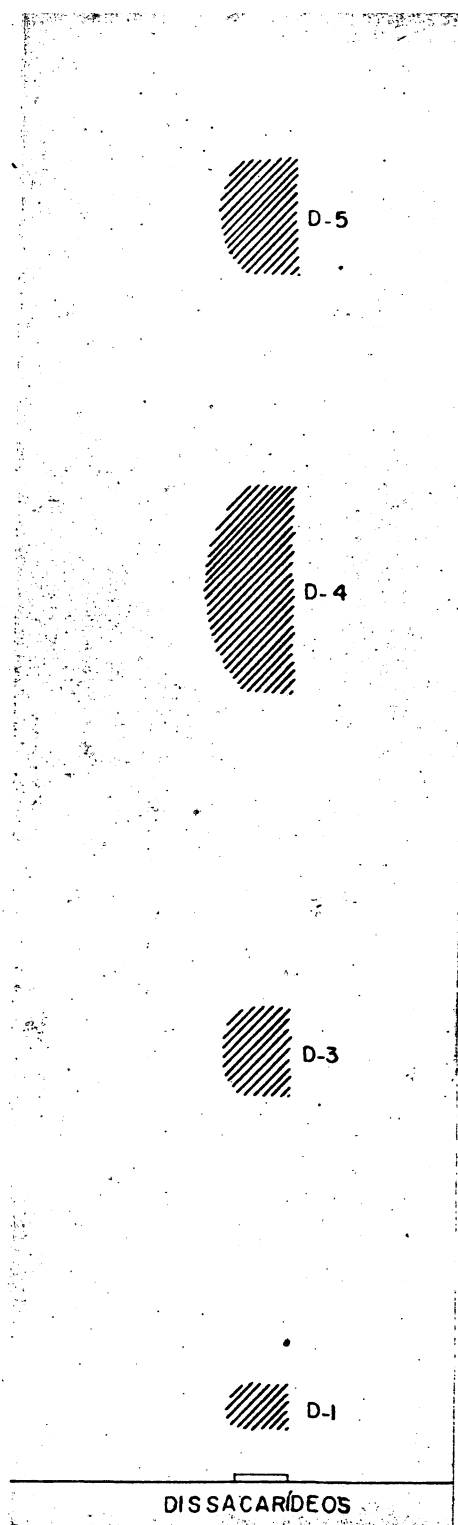


Fig. 12 - Cromatografia em papel Whatman nº 3 MM (descendente) dos dissacarídeos resultantes da hidrólise parcial da fração B<sub>1</sub> com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N e separados da fração S<sub>2</sub> por intermédio de uma coluna de carvão-celite.

Solvente: benzeno; n-butanol; piridina; água, 1:5:3:3.

Revelador: cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio.

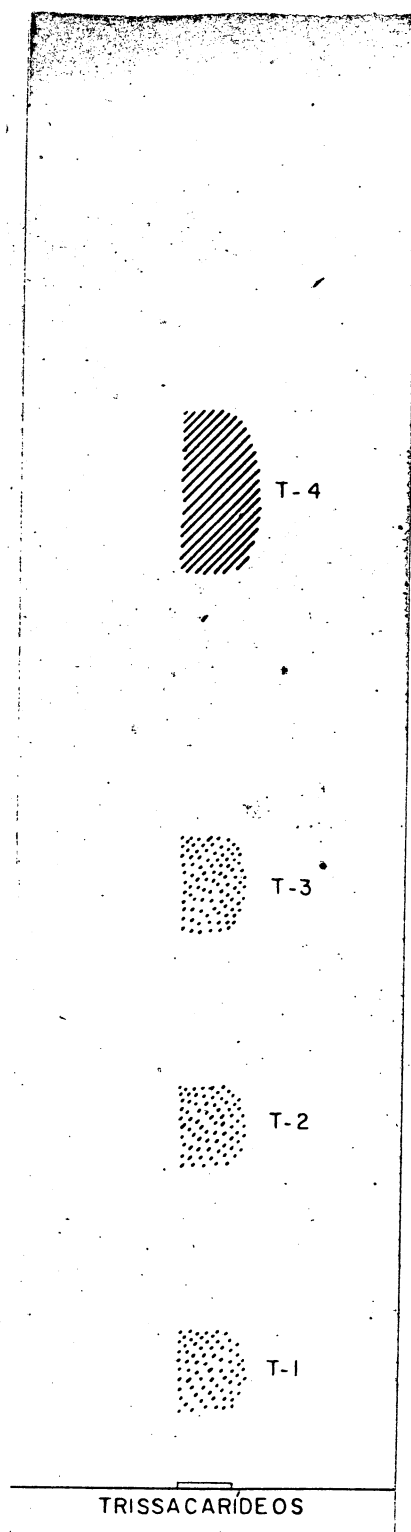


Fig. 13 - Cromatografia em papel Whatman nº 3 MM (descendente) dos trissacarídeos resultantes da hidrólise parcial da fração B<sub>1</sub> com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N e separados da fração S<sub>2</sub> por intermédio de uma coluna de carvão-celite.

Solvente: benzeno; n-butanol; piridina; água, 1:5:3:3.

Revelador: cloridrato de p-anisidina.

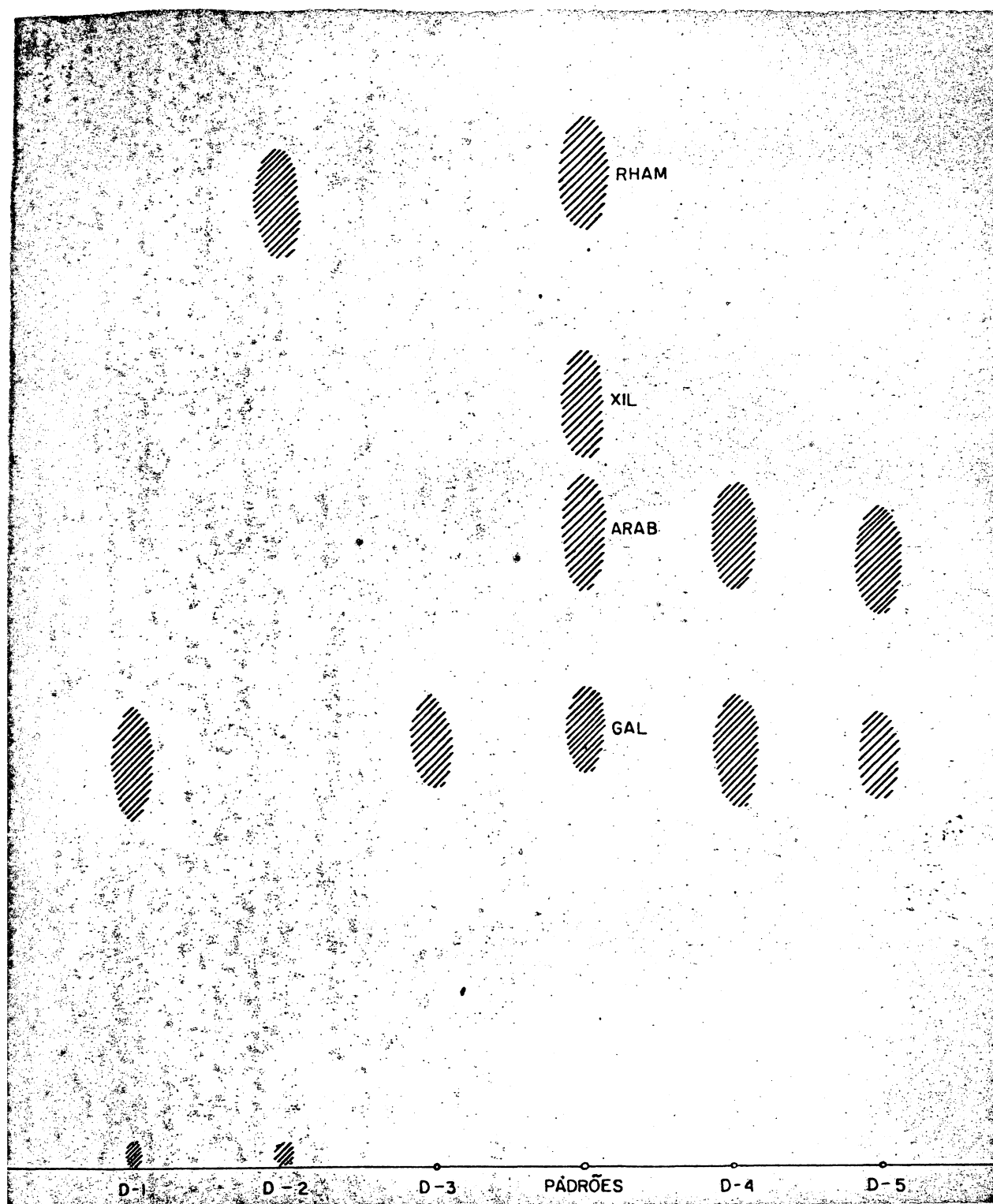


Fig. 14 - Cromatografia em papel Whatman nº 4 (descendente) dos hidrolisados ácidos totais dos dissacarídeos D-1, D-2, D-3, D-4 e D-5.

Solvente: benzeno; n-butanol; piridina; água, 1:5:3:3.

Revelador: cloridrato de p-anisidina.

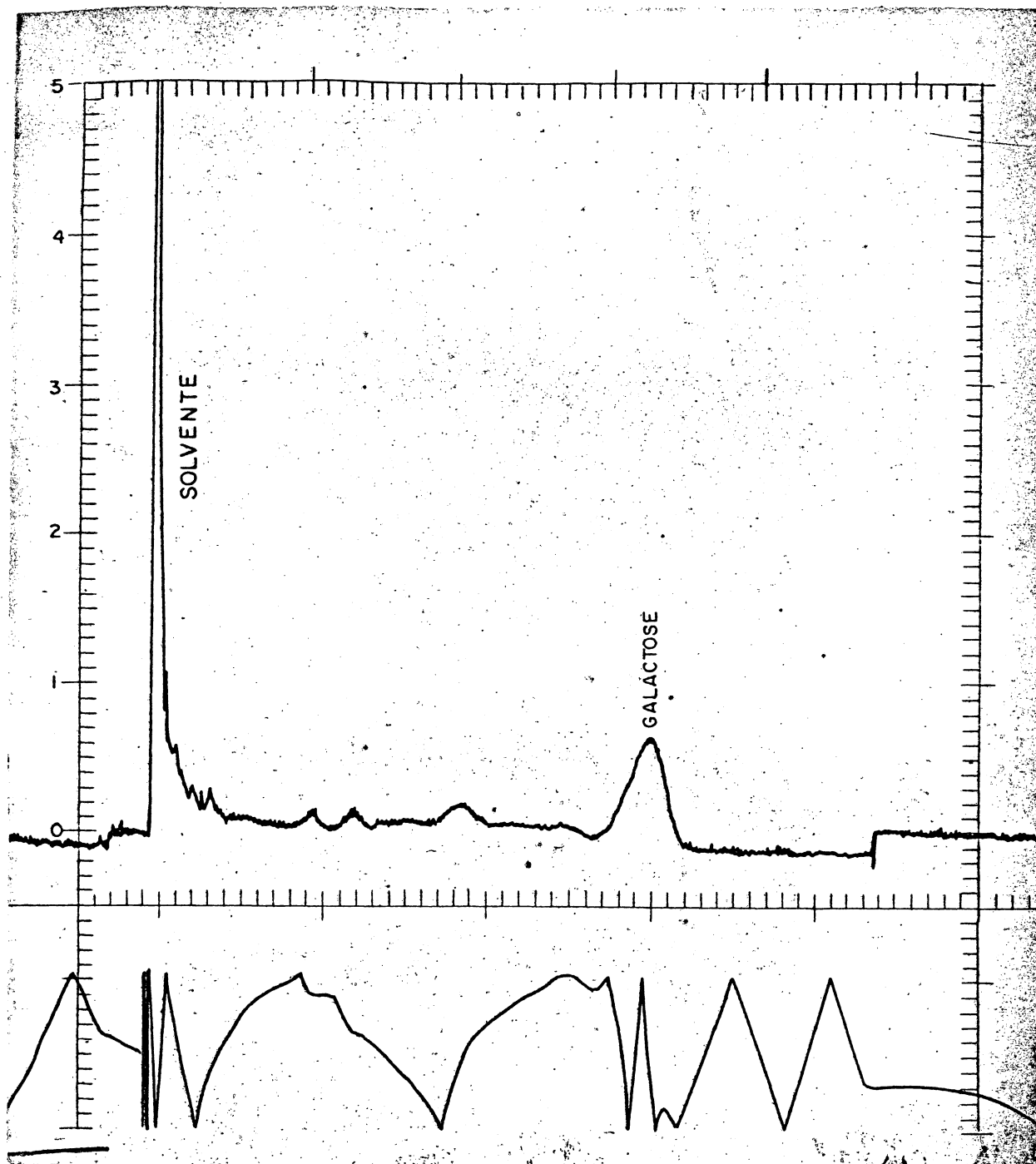


Fig. 15 - Cromatografia em fase gasosa (termocondutiva) dos alditóis acetilados do hidrolisado ácido do dissacarídeo D-3, dissolvidos em clorofórmio. Instrumento F & M - Modelo 810-19 (F & M Scientific Co), coluna (3 x 1300 mm) de 5% de DEGS (succinato de dietilenoglicol) em chromosorb W. Temperatura da coluna (isotérmica) de 200°C e fluxo do gás de arraste (hélio) de 60 ml/min.

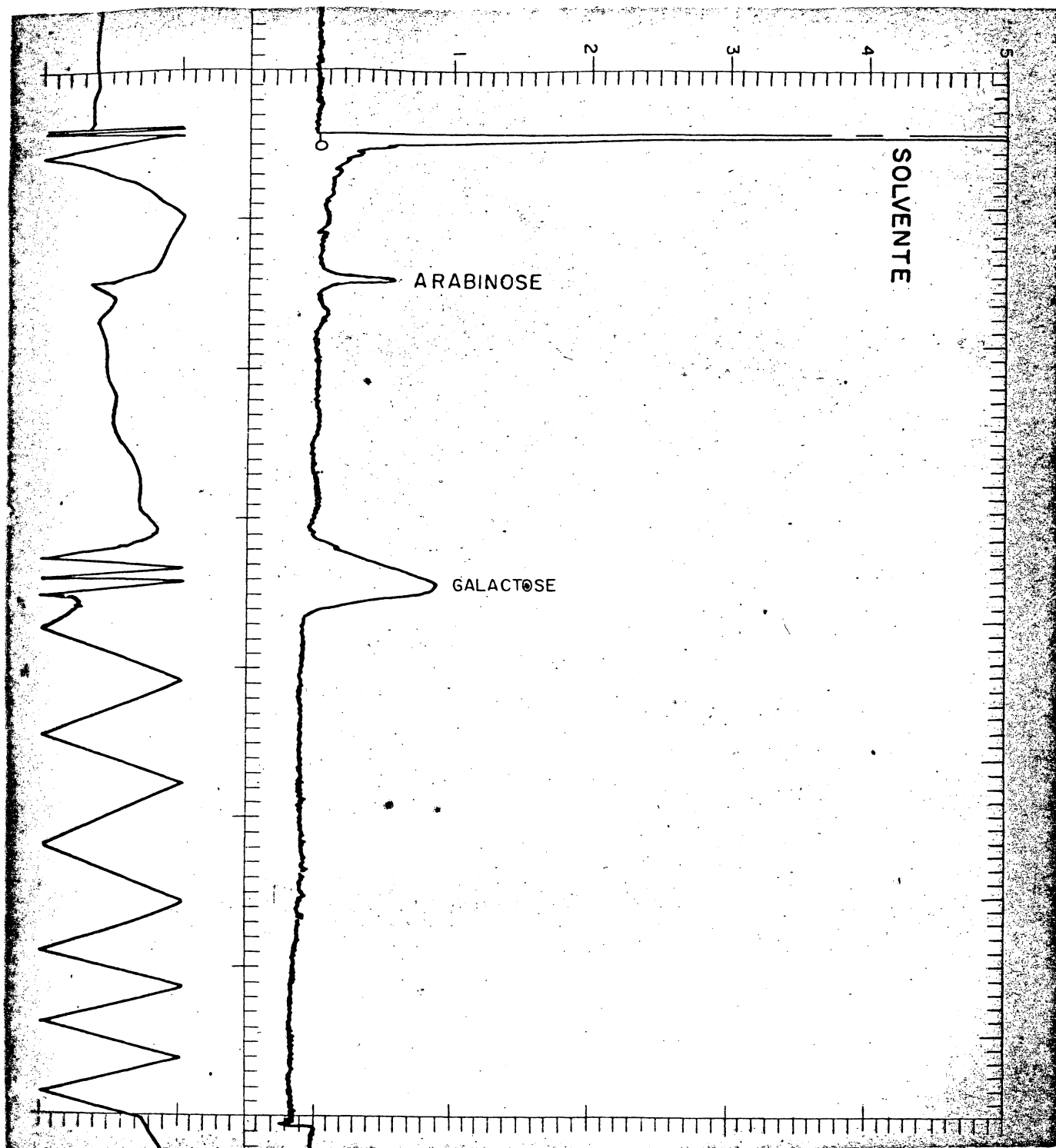


Fig. 15 - Cromatografia em fase gasosa (termocondutiva) dos alditóis acetilados do hidrolisado ácido do dissacarídeo D-4, dissolvidos em clorofórmio. Instrumento F & M - Modelo 810-19 (F & M Scientific Co), coluna (3 x 1300 mm) de 5% de DEGS (succinato de dietilenoglicol) em chromossorb W. Temperatura da coluna (isotérmica) de 200°C e fluxo do gás de arraste (hélio) de 50 ml/min.

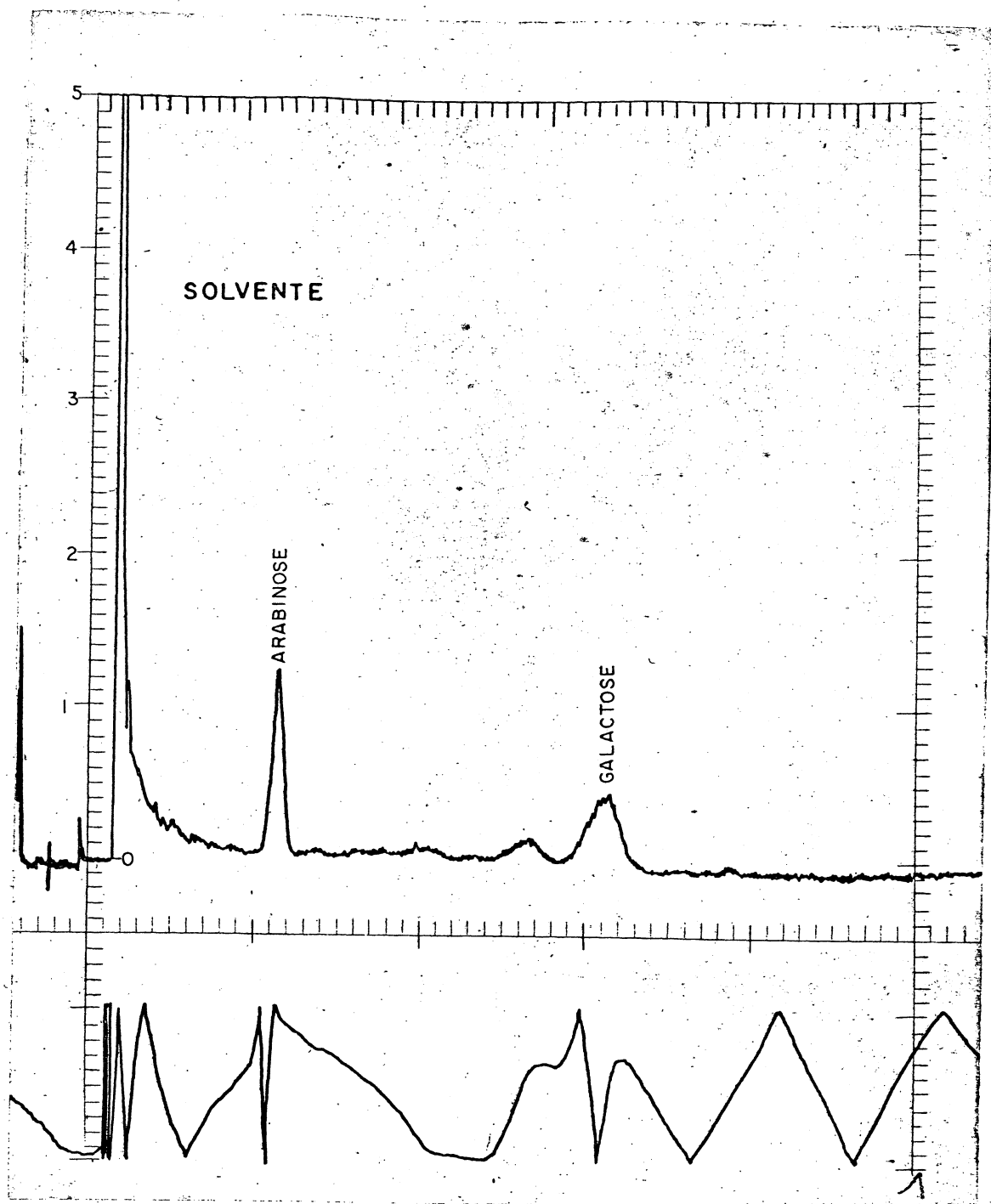


Fig. 17 - Cromatografia em fase gasosa (termocondutiva) dos alditóis acetilados do hidrolisado ácido do dissacarídeo D-5, dissolvidos em clorofórmio. Instrumento F & M - Modelo 310-19 (F & M Scientific Co), coluna (3 x 1800 mm) de 5% de DEGS (succinato de dietilenoglicol) em cromossorb W. Temperatura da coluna (isotérmica) de 200°C e fluxo do gás de arraste (hélio) de 60 ml/min.



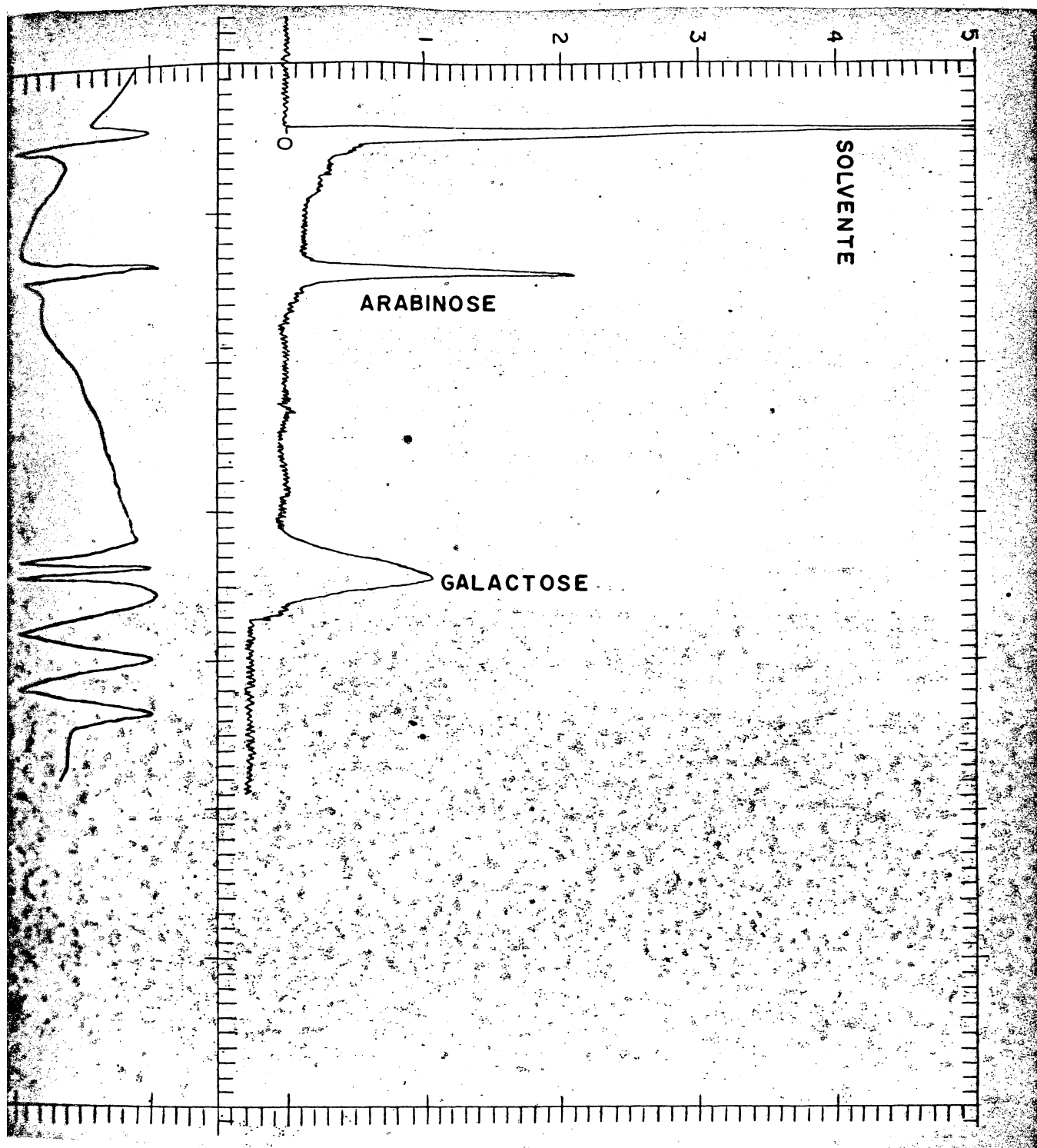


Fig. 13 - Cromatografia em fase gasosa (termocondutiva) dos alditóis acetilados do hidrolisado ácido do trissacarídeo T-4, dissolvidos em clorofórmio. Instrumento F & M - Modelo 310-19 (F & M Scientific Co), coluna (3 x 1300 mm) de 5% de DEGS (succinato de dietilenoglicol) em chromossorb W. Temperatura da coluna (isotérmica) de 200°C e fluxo do gás de arraste (hélio) de 60 ml/min.

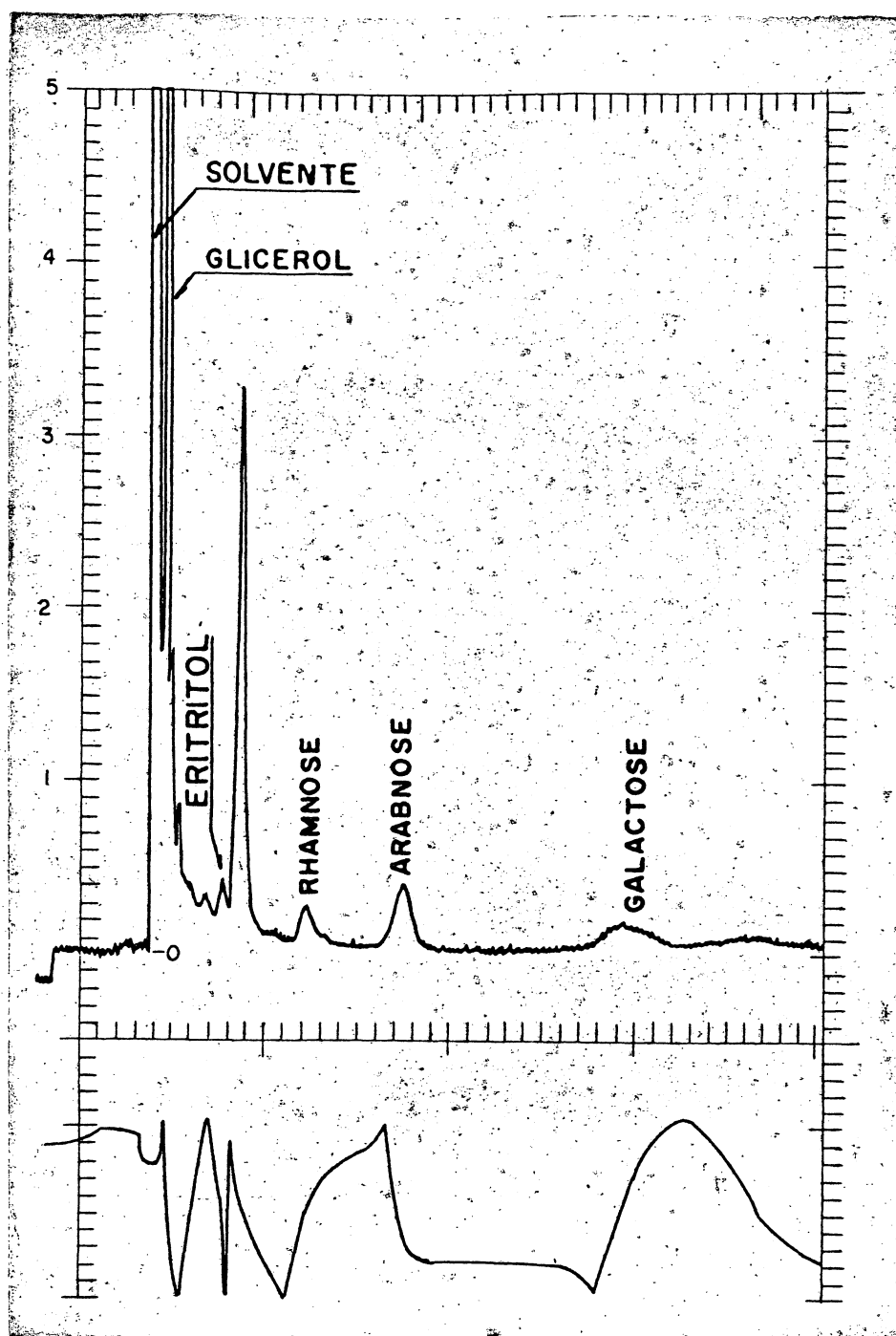


Fig. 20 - Cromatografia em fase gasosa (termocundutiva) dos produtos (alditóis acetilados) da degradação de Smith da fração B<sub>1</sub>, dissolvidos em clorofórmio. Instrumento F & M - Modelo 310-19 (F & M Scientific Co), coluna (3 x 1300 mm) de 5% de DEGS (succinato de dietilenoglicol) em chromosorb W. Temperatura da coluna (isotérmica) de 180°C e fluxo do gás de arraste (hélio) de 60 ml/min.

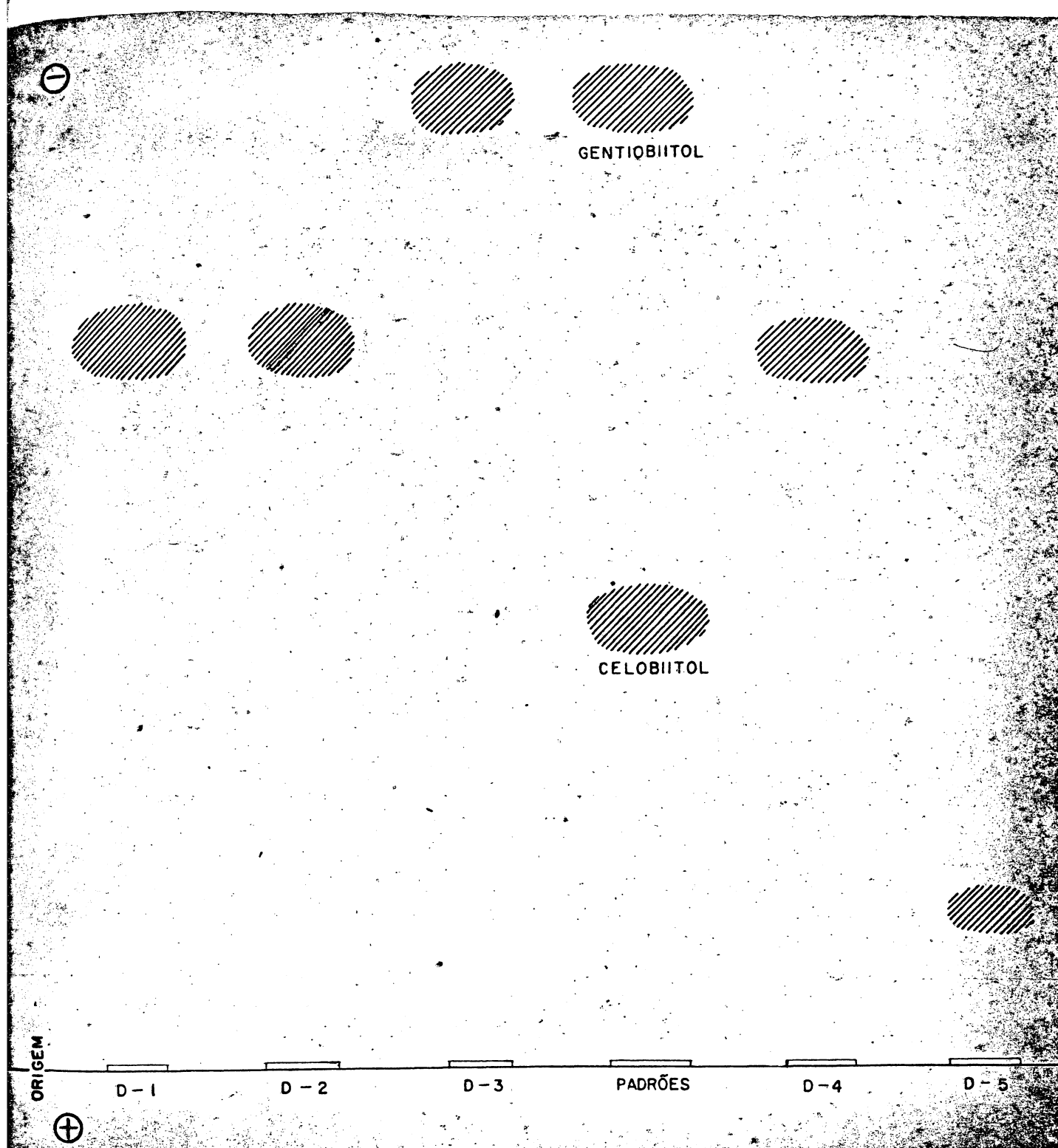


Fig. 19 - Eletroforese em papel Whatman nº 1, em tampão molibdato 0,1M, pH 5, durante 2 horas a 20 V/cm, dos dissacarídeos alditóis D-1, D-2, D-3, D-4 e D-5, usando-se o celobiitol e o gentiobiitol como referências. As manchas foram visualizadas com o nitrato de prata alcalino.

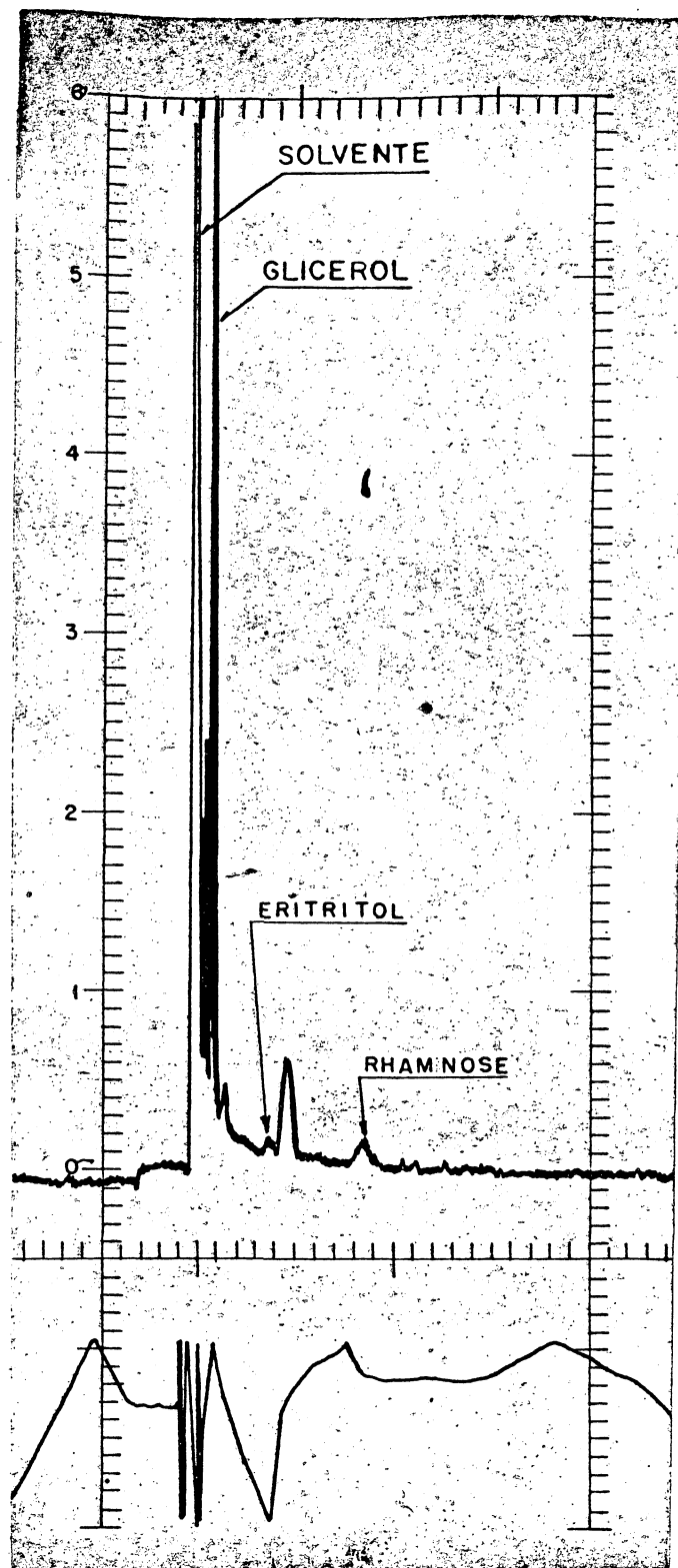


Fig. 21 - Cromatografia em fase gasosa (termocondutiva) dos produtos (alditóis acetilados) da degradação de Smith da fração B<sub>2</sub>, dissolvidos em clorofórmio. Instrumento F & M - Modelo 310-19 (F & M Scientific Co), coluna (3 x 1300 mm) de 5% de DEGS (succinato de dietilenoglicol) em chromosorb W. Temperatura da coluna (isotérmica) de 130°C e fluxo do gás de arraste (hélio) de 30 ml/min.

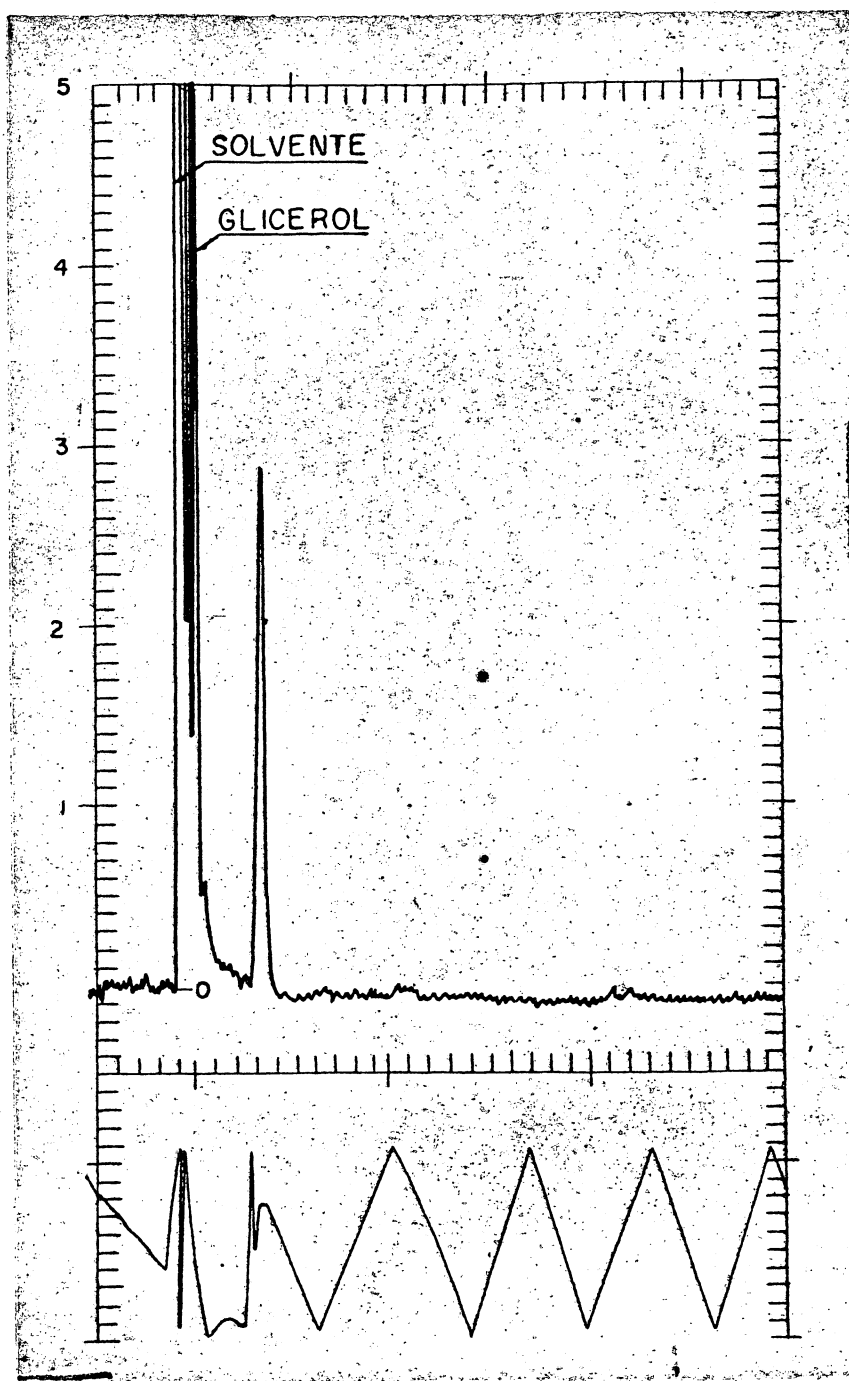


Fig. 22 - Cromatografia em fase gasosa (termocondutiva) dos produtos (alditóis acetilados) da degradação de Smith do dissacarídeo D-4, dissolvidos em clorofórmio. Instrumento F & M - Modelo 810-19 (F & M Scientific Co), coluna (3 x 1300 mm) de 5% de DEGS (succinato de dietilenoglicol) em chromosorb W. Temperatura da coluna (isotérmica) de 130°C e fluxo do gás de arraste (hélio) de 50 ml/min.

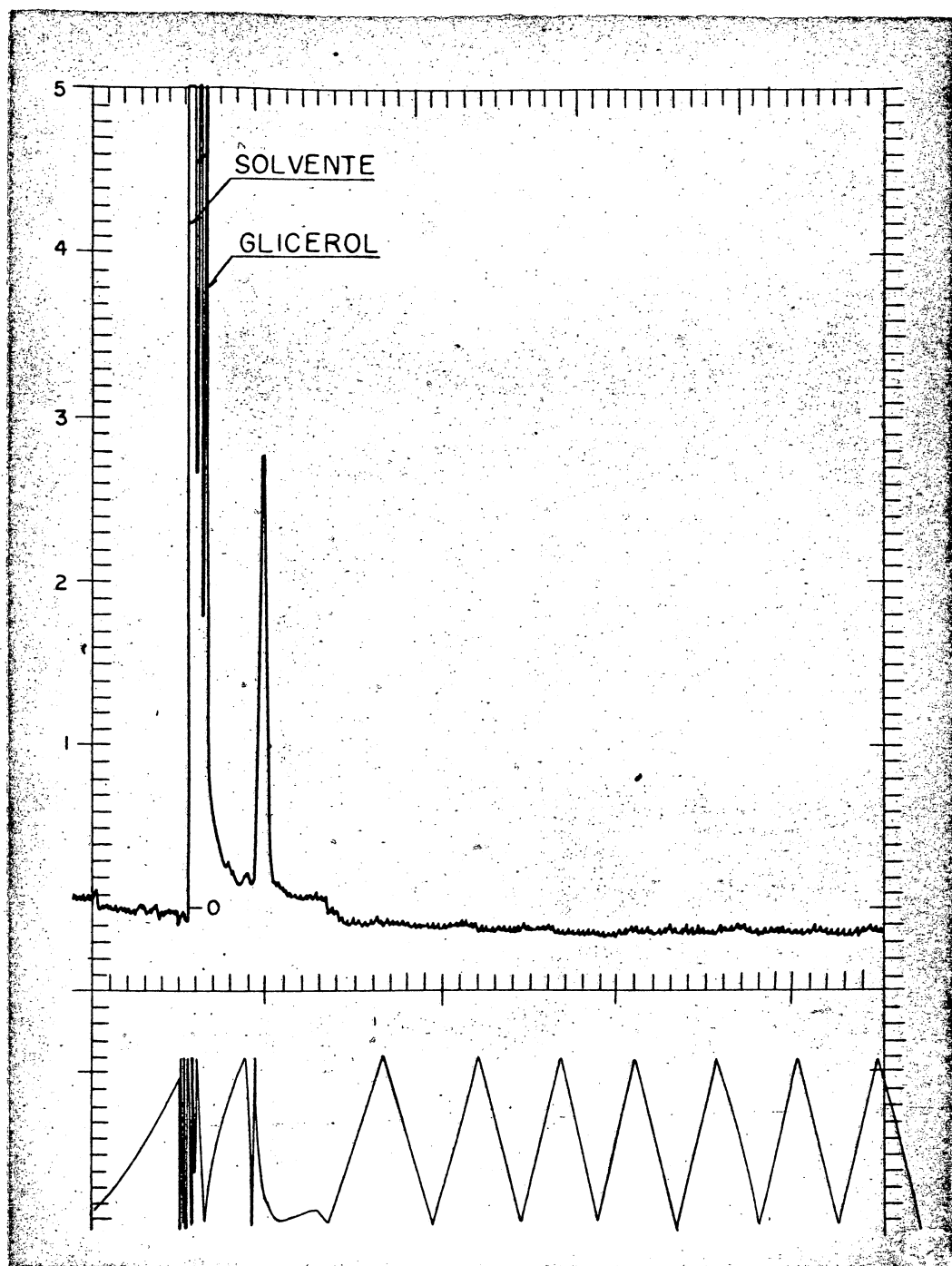


Fig. 23 - Cromatografia em fase gasosa (termocondutiva) dos produtos (alditóis acetilados) de degradação de Smith do trissacarídeo T-4, dissolvidos em clorofórmio. Instrumento F & M - Modelo 810-19 (F & M Scientific Co), coluna (3 x 1800 mm) de 5% de DEGS (succinato de dietilenoglicol) em chromosorb W. Temperatura da coluna (isotérmica) de 130°C e fluxo do gás de arraste (hélio) de 60 ml/min.

## DISCUSSÃO

O processo de extração alcalina, visando a obtenção de polissacarídeos neutros, pela utilização do hidróxido de cálcio, descrito por Jones e Tanaka (24), apresenta a conveniência de ser menos drástico para os açúcares neutros, ao mesmo tempo que elimina a fração ácida pela degradação e precipitação do ácido pécico na forma de pectato de cálcio. Este método foi adotado, com sucesso, na extração de polissacarídeos neutros de material pécico de frutos de café cereja. Assim, foi possível obter-se duas frações polissacarídicas, uma solúvel, contendo principalmente polissacarídeos neutros e outra insolúvel, contendo a mistura de outros polissacarídeos neutros e o ácido pécico degradado na forma de pectina de cálcio. A utilização de detergente (brometo de hexadeciltrimetilamônio, cetavlon), em tampão borato e pH 12,5, permitiu o fracionamento da fração solúvel em duas outras frações A e B, respectivamente.

A precipitação de polianions de soluções aquosas por meio de uma grande variedade de cations é conhecida há bastante tempo (49) e foi inicialmente observada por Kuhn e Bielig em 1940 (50), na reação de precipitação de detergentes de ions de amônio quartenário com proteínas. Um pouco mais tarde, em 1943, Powney (51) verificou que o hexametáfosfato foi precipitado pelo cloreto de cetilpiridíneo e, em 1949, Jaques e col. (52), usando semelhante reação, conseguiram isolar a heparina do sangue por intermédio do cloreto de octilamina. Em 1953, Jones (53) preparou ácido nucléico via complexo insolúvel de cetiltrimetilamônio e lembrou que o alginato e outros polianions carboxílicos também formavam precipitados insolúveis. A precipitação de polianions sulfatados com cetiltrimetilamônio foi relatada por vários autores em 1955 (54, 55, 56 e 57). Nestas condições, os polissacarídeos neutros não precipitam com detergentes, em pH 7. Entretanto, a precipitação com cetavlon pode ocorrer desde que os polissacarídeos neutros sejam convertidos em polianions pela formação de complexos com o borato ou pela ionização de seus grupos hidroxílicos, em pH superior a 12 (25 e 53).

No presente trabalho, a precipitação foi realizada pela adição de tampão borato em pH 12,5, embora ela também possa ocorrer sem boratação em pH elevado. Entretanto, os resultados obtidos com o boratação foram mais eficientes.

A fração A, que complexou com o cetavlon, anteriormente estudada, mostrou dados analíticos compatíveis com os resultados já obtidos para vários arabanos, por outros autores (19). A fração B, sobrenadante da precipitação com o cetavlon, mostrou ser heterogênea em eletroforese em papel, e por filtração em Sephadex G-100 foi separada em duas frações F-I e F-II (Fig. 5). Por outro lado, a degradação controlada desta fração B, por intermédio da hidrólise parcial fraca com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01N, 90-95°C, resultou na obtenção de um único polissacarídeo, (fração B<sub>1</sub>) homogêneo tanto em eletroforese em papel como por filtração em Sephadex G-100 (Fig. 7). A parte totalmente hidrolisada, fração S<sub>1</sub> (Fig. 9), correspondia ao pico F-I da Fig. 5 e era formada quase que exclusivamente por resíduos de arabinose, enquanto que o polissacarídeo B<sub>1</sub> residual desta hidrólise, correspondia ao pico F-II e era formado principalmente por resíduos de galactose e arabinose (Fig. 6). A facilidade com que o componente F-I foi hidrolisado, sugere formas furanosídicas para os resíduos de arabinose e permite supor que se trata de um arabano presente na fração B.

A fração B<sub>1</sub> era formada principalmente por resíduos de galactose e arabinose, em proporções aproximadamente equimoleculares, conforme demonstra o gráfico da Fig. 3. A hidrólise parcial desta fração resultou na obtenção de vários oligossacarídeos (5 dissacarídeos e 4 trissacarídeos), indicados nas Fig. 11 e Fig. 13.

A análise, por diferentes métodos, dos oligossacarídeos resultantes da hidrólise parcial de polissacarídeos fornece valiosas informações a respeito das estruturas destas macromoléculas, principalmente das mais complicadas. Assim, um dos métodos mais empregados é o da migração eletroforética em papel, tampão molibdato pH 5, estabelecido por Bourne e col. (31), na qual as mobilidades relativas dos dissacarídeos alditóis são dependentes do tipo de ligação glicosídica e se verificam na seguinte ordem: (1-3) (1-4) (1-6) (1-2).

Também a análise pela galactose oxidase, que é específica para D-galactopirranose e seus derivados com as posições C-4 e C-6 livres (44), se constitui em muitos casos, em excelente instrumento para a determinação de estrutura de oligossacarídeos.

Um outro processo analítico do qual se pode tirar informações sobre a estrutura de oligossacarídeos é o da oxidação de dissacarídeos alditóis com o metaperiodato de sódio. Este método foi utilizado por Wolfrom e col. (59) para a diferenciação entre as estruturas do maltitol e isomaltitol. Verificaram os referidos autores que as estruturas de dissacarídeos com ligação glicosídica (1-6), tal como o isomaltitol, podem ser definidas pela oxidação com o periodato, na qual o consumo de oxidante é normal e a liberação de ácido fórmico é de quatro moles por mol de dissacarídeo alditol. O mesmo não ocorre com dissacarídeos com ligação (1-4), como o maltitol. Neste caso, a oxidação é anormal e resulta na completa destruição da molécula, com a liberação de sete moles de ácido fórmico por mol de dissacarídeo alditol, através de um processo de "overoxidation", devido à formação intermediária de um grupo metileno, duplamente ativado pelos grupos carbonílicos formados. Semelhante raciocínio poderia ser aplicado a dissacarídeos alditóis com ligações (1-2) ou (1-3), uma vez que também nestes casos ocorre a formação intermediária do grupo metileno ativado por grupo carbonílico.

Por outro lado, a indicação da presença de ligações glicosídicas (1-2) em dissacarídeos, pode ser ainda obtida por intermédio da reação com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (32). Esta reação só se processa quando existe a possibilidade de formação do enediol intermediário entre C-1 e C-2 ou ainda, entre C-2 e C-3. Desde que C-2 ou C-1 estejam bloqueados, quer por ligações glicosídicas, quer por grupos éteres, a reação não se verifica.

Deste modo, o dissacarídeo D-1, formado por resíduos de ácido galacturônico e galactose, Fig. 14, apresentou um valor de ácido fórmico liberado em sua oxidação com periodato (tabela V) característico de reação normal e bastante próximo aos de dissacarídeos com ligações 1-6. Porém, a sua mobilidade eletroforética (tabela IV e Fig. 19) foi intermediária às do celobiotol- $\beta$ -D-(1-4) e gentiobiotol- $\beta$ -D-(1-6). Este comportamento pode ser atribuído à interferência do grupo carboxílico presente neste dissacarídeo. Os resultados da tabela III indicam que o dissacarídeo D-1 não deu reação com a galactose oxidase, demonstrando com isto que as posições C-4 ou C-6 estavam bloqueadas. Como o bloqueio de C-4 acarretaria na formação de apreciável quantidade de eritritol entre os produtos da degradação de Smith da fração B<sub>1</sub> (Fig. 20), o que não ocorreu, pode-se supor que a provável estrutura do dissacarídeo D-1 era a do ácido aldo-biurônico galacturônico-(1-6)-galactose.

O dissacarídeo D-2, formado pelos resíduos de ácido galacturônico e rhamnose (Fig. 14), mostrou mobilidade eletroforética idêntica à do dissacarídeo D-1, conforme mostram a tabela IV e Fig. 19. O resultado de sua oxidação com o periodato, indicado na tabela V, com excessiva liberação de ácido fórmico através do processo de



"overoxidation", demonstrou que sua estrutura não poderia ser definida por este método, uma vez que as ligações glicosídicas (1-2), (1-3) ou (1-4) apresentem todas este comportamento. Entretanto, este dissacarídeo foi o único que não deu a reação com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, conforme mostra a Fig. 12. Portanto, a sua estrutura mais provável seria a do ácido aldobiurônico galacturônico-(1-2)-rhamnose. Além disso, ácidos aldobiurônicos com esta estrutura foram isolados dos hidrolisados parciais de todos os materiais pécticos até o momento estudados (20).

O dissacarídeo D-3, formado unicamente por resíduos de galactose, Fig. 14 e Fig. 15, migrou em eletroforese com mobilidade idêntica à do gentiobitol, que é  $\beta$ -D-(1-6). Também a oxidação com o periodato deste dissacarídeo transcorreu normalmente, com a liberação de uma quantidade de ácido fórmico (tabela V) compatível com ligação glicosídica (1-6). Além disso, o resultado de sua análise pela galactose oxidase, tabela III, com o valor de 50% de D-galactose em relação ao açúcar total, confirmou que a metade dos resíduos de galactose deste dissacarídeo estava bloqueada em C-4 ou C-6. Como já foi excluída a possibilidade do bloqueio em C-4, pode-se concluir que a estrutura deste dissacarídeo era 6-O-D-galactopiranosilgalactopiranoose.

Quanto a D-4, no qual foram identificadas a arabinose e a galactose (Fig. 14), tudo leva a crer que se tratava de uma mistura de dissacarídeos. De fato, ao ser visualizada pelo cloridrato de p-anisidina, a mancha correspondente a D-4 apresentou duas zonas de coloração diferentes (Fig. 11), uma colorida de vermelho vivo, característica de pentoses e a outra colorida de amarelo, que é desenvolvida por hexoses. Além disso, a análise de seu hidrolisado ácido por cromatografia gasosa de uma relação de arabinose: galactose de aproximadamente 1:3 (Fig. 16), e não 1:1, como era de se esperar se fôsse apenas um dissacarídeo. Por outro lado, tanto o seu comportamento eletroforético (Fig. 19), com mobilidade intermediária às do celobitol- $\beta$ -D-(1-4) e gentiobitol- $\beta$ -D-(1-6), como o resultado de sua oxidação com o periodato (tabela V), com excessiva liberação de ácido fórmico, não foram suficientes para a caracterização de qualquer espécie de ligação glicosídica presente em sua estrutura.

Contudo, os dados da tabela III demonstram que a galactose oxidase dosou cerca de 10% da galactose que o constituía. Portanto, estes açúcares encontravam-se em D-4 na forma de D-galactose com C-4 ou C-6 livres. Desta forma, este resultado, associado ao obtido na visualização de sua mancha com o cloridrato de p-anisidina, sugere que, pelo menos, um dos constituintes de D-4 era um dissacarídeo de D-galactose-arabinose.

O dissacarídeo D-5, no qual foram identificados a galactose e a arabinose (Fig. 14 e Fig. 17), apresentou pequena mobilidade eletroforética, conforme mostram a Fig. 19 e tabela IV. Este comportamento é próprio dos dissacarídeos portadores de ligação glicosídica (1-3). Aliás, este tipo de ligação glicosídica a resíduos de arabinose foi confirmada pela análise dos produtos da degradação de Smith da fração B<sub>1</sub> (Fig. 20), na qual este açúcar apareceu como produto resistente à oxidação com o periodato, devido ao bloqueio de sua posição C-3. Um indício de que o açúcar redutor deste dissacarídeo era a arabinose, foi obtido através da visualização de seu cromatograma em papel com o cloridrato de p-anisidina. A coloração vermelho vivo desenvolvida por sua mancha mostrou que a ponta redutora do dissacarídeo era uma pentose (31). Entretanto, contrariamente ao esperado, a velocidade de reação deste dissacarídeo com a galactose oxidase foi demasiadamente lenta em relação ao dissacarídeo D-3, como pode-se observar pelos resultados da tabela III, na qual apenas 2,6% de D-galactose do dissacarídeo D-5 foram dosados nas mesmas condições de reação.

Desde que são remotas as possibilidades da presença de resíduos de galactose com formas L e conformações furanosídicas, uma possível explicação para este fato seria a de que este dissacarídeo tenha se comportado frente à galactose oxidase de modo semelhante a outros compostos que, embora contenham resíduos de D-galactose com C-4 e C-6 livres, como por exemplo a lactose, também não são bons substratos para esta enzima (44).

De acordo com os dados da tabela V, este dissacarídeo sofreu um processo de "overoxidation" quando oxidado com o periodato, liberando 5,5 moles de ácido fórmico por mol de dissacarídeo alditol. Com isto ficou eliminada a possibilidade de ligação através (1-5) visto que, neste caso, onde a ponta redutora era uma pentose, a liberação de ácido fórmico seria de 3 moles por mol de dissacarídeo alditol, para uma oxidação normal. Também a ligação através (1-2) neste dissacarídeo foi excluída pela reação positiva com o clorato de 2,3,5-trifeniltetrazólio. Portanto, os dados analíticos sugerem para este dissacarídeo uma estrutura de galactose-(1-3)-arabinose.

A existência de ligações glicosídicas entre resíduos de galactose e arabinose na fração B<sub>1</sub> foi também reforçada pelo isolamento de um dos trissacarídeos da sua hidrólise parcial, o trissacarídeo T-4. A análise por cromatografia gasosa dos açúcares componentes deste trissacarídeo (Fig. 13) indicou a relação de 2:1 de galactose arabinose.

Como não foi possível identificar um dos produtos da degradação de Smith das frações B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Fig. 20 e Fig. 21), produto este obtido também da degradação do dissacarídeo D-4 e trissacarídeo T-4 (Fig. 22 e Fig. 23), a determinação de um dos tipos de ligação glicosídica entre galactose e arabinose destes oligossacarídeos ficou prejudicada.

Tendo em vista os resultados obtidos, infere-se que na porção neutra de polissacarídeos do material pectico de frutos de café cereja exista um heteropolissacarídeo (fração B<sub>1</sub>) formado principalmente por resíduos de galactose e arabinose, em proporções aproximadamente equimoleculares (galactoarabano) (Fig. 8), com estrutura complexa e altamente ramificada. A obtenção de um polímero de galactose pela hidrólise parcial deste galactoarabano, na proporção de 49% do total, fração B<sub>2</sub>, permitiu o esclarecimento de uma parte da estrutura deste polissacarídeo.

Os dados da oxidação com o periodato e degradação de Smith da fração B<sub>2</sub>, são indicativos de que neste polímero os resíduos de galactose estejam interligados através ligações glicosídicas (1-6), dispostas linearmente, aos quais estariam ainda ligados restos de rhamnose e ácido galacturônico na forma de pequenas ramificações, possivelmente na posição C-4 da galactose, tendo em vista a formação de pequena quantidade de eritritol entre os produtos da degradação de Smith. A possibilidade da existência destas ramificações foi também evidenciada pelo menor consumo de periodato e liberação de ácido fórmico, na proporção de 1,47:0,716 (tabela VI), em vez de 2:1, como era de se esperar se esta fração B<sub>2</sub> contivesse exclusivamente ligações 1-6. Por outro lado, a presença deste tipo de ligação neste polissacarídeo foi corroborada pelo isolamento do dissacarídeo D-3 do hidrolisado parcial, cuja estrutura foi demonstrada ser 6-O-D-galactopiranosilgalactopirranose.

A complexidade estrutural do galactoarabano pode ser avaliada pela variedade de oligossacarídeos, identificados no seu hidrolisado parcial (5 dissacarídeos e

4 trissacarídeos), dissacarídeos tais como Galp-(1-6)-Galp, Galp-(1-3)-Araf, Galacturônico-(1-6)-Galp e Galacturônico-(1-2)-Rhamp. A presença de galactose entre os resíduos da degradação de Smith do galactoarabano (Fig. 20) indica ainda a possibilidade da existência de ligações glicosídicas a C-3 deste açúcar.

Os dados de polarimetria  $[\alpha]_D^{20} + 23$  (água) para a fração B<sub>1</sub> e  $[\alpha]_D^{20} + 27$  (água) para as frações B<sub>2</sub>, bem como o resultado da análise pela galactose oxidase do dissacarídeo D-3, são consistentes com as formas D para os resíduos de galactopirranose e L para os resíduos de arabinofuranose deste galactoarabano. Por outro lado, os espectros infravermelhos destas mesmas frações, examinadas na região de 1000-700 cm<sup>-1</sup>, apresentaram banda de moderada intensidade em 390 cm<sup>-1</sup>, característica de centrifugações β.

Deste modo, pode-se supor que este galactoarabano seja constituído de uma espinha dorsal de resíduos de galactose interligados através ligações glicosídicas β-D-(1-6) e de cadeias laterais constituídas principalmente de arabinose, galactose, ácido galacturônico e rhamnose.

O isolamento dos aldobiurônicos Galacturônico-(1-6)-galactose e Galacturônico-(1-2)-rhamnose do hidrolisado parcial do galactoarabano evidencia a possibilidade de que, no material péctico de frutos de café cereja, a porção neutra constituída pelo galactoarabano e arabano esteja glicosidicamente ligado à fração ácida, formada pelo ácido péctico e ácido pectínico. Esta possibilidade, aliás, já fôra anteriormente preconizada por Barreth e Northcote (20) quando estudaram o material péctico de maçã.

Embora tenham sido determinados vários tipos de ligações glicosídicas presentes no galactoarabano da porção neutra do material péctico de frutos de café cereja, os dados obtidos no trabalho ora realizado não foram suficientes para a elucidação de sua estrutura definitiva.

## CONCLUSÕES

- 1 - A porção de polissacarídeos neutros do material pectico dos frutos de café cereja contém um heteropolissacarídeo formado, principalmente, por resíduos de galactose e arabinose, em proporções aproximadamente equimoleculares.
- 2 - A presença de ligações glicosídicas entre resíduos de galactose e arabinose deste heteropolissacarídeo foi evidenciada pela análise dos oligossacarídeos obtidos de sua hidrólise parcial, na qual foram identificados dois dissacarídeos (D-4 e D-5) e um trissacarídeo (T-4), formados por estes açúcares. Foi ainda demonstrada que a ligação glicosídica do dissacarídeo D-5 era do tipo (1-3).
- 3 - Este heteropolissacarídeo (galactoarabano) apresenta uma estrutura complexa, altamente ramificada, conforme ficou evidenciado pelos dados de sua hidrólise parcial, oxidação com periodato e degradação de Smith.
- 4 - Foi constatado que uma parte de sua estrutura, correspondente a cerca de 40% do heteropolissacarídeo é constituída de resíduos de galactopiranosose interligados através ligações glicosídicas  $\beta$ -D-(1-6).

## AGRADECIMENTOS

O autor agradece especialmente à Dra. Déa Amaral Ferreira do Amaral, pela orientação e estímulo prestados. Em particular, à Dra. Glaci Terezinha Zancan, pela colaboração imprescindível, tornando possível o presente trabalho.

Aos componentes do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e da Divisão de Bioquímica do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas, bem como ao Prof. Dr. Milton Giovanonni, Diretor do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, e Dr. Alceu Schwab, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

## BIBLIOGRAFIA

1. VAUGUELIN, M. - Ann. Chim., 5: 92, 1790.
2. PAYEN, A. - Ann. Chim. Phys., 25(2): 329, 1824.
3. BRACONNOT, H. - Ann. Chim. Phys., 23(2): 173, 1825.
4. EHRLICH, F. & SOMMERFELD, R. von - Biochem. Z., 163: 263, 1926.
5. EHRLICH, F. & SCHUBERT, F. - Biochem. Z., 203: 343, 1923.
6. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. - J. Chem. Soc., 495, 1933.
7. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. - J. Chem. Soc., 452, 1939.
8. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. - J. Chem. Soc., 454, 1939.
9. BEAVEN, G.H., HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. - J. Chem. Soc., 1365, 1939.
10. BEAVEN, G.H. & JONES, J.K.N. - J. Chem. Soc., 1218, 1947.
11. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. - J. Chem. Soc., 1221, 1947.
12. HIRST, E.L., JONES, J.K.N. & WALDER, W.O. - J. Chem. Soc., 1225, 1947.
13. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. - J. Chem. Soc., 2311, 1948.
14. MIYAMA, R. - J. Dept. Agr. Kynshu Imp. Univ., 4: 195, 1936.
15. HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. - Advan. Carbohydrate Chem., 2: 235, 1946.
16. ASPINALL, G.O. & CANAS-RODRIGUEZ, A. - J. Chem. Soc., 4020, 1953.
17. ASPINALL, G.O. & FANSHAW, R.S. - J. Chem. Soc., 4215, 1961.
18. ANDREWS, P., HOUGH, L., POWELL, D.R. & WOODS, B.M. - J. Chem. Soc., 774, 1959.
19. CORRÊA, J.B.C. - Polissacarídeos neutros hidrossolúveis do epicarpo e mesocarpo de frutos de café cereja. Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1963.
20. BARRETH, A.J. & NORTHCOTE, D.H. - Biochem. J., 94: 617, 1965.
21. STODDARD, R.W., BARRETH, A.J. & NORTHCOTE, D.H. - Biochem. J., 102: 194, 1957.
22. TIMELL, T.E. - Advan. Carbohydrate Chem., 20: 409, 1965.
23. ASPINALL, G.O. & BAILLIE, J. - J. Chem. Soc., 1714, 1963.

24. JONES, J.K.N. & TANAKA, Y. - Methods Carbohydrate Chem., 5: 74, 1955.
25. SCOTT, J.E. - Chem. Ind. (London), 163, 1955.
26. BARKER, S.A., STACEY, M. & ZWEIGEL, G. - Chem. Ind. (London), 330, 1957.
27. BARKER, S.A., FOSTER, A.B., SIDDIQUI, I.R. & STACEY, M. - J. Chem. Soc., 2353, 1953.
28. WHISTLER, R.L. & DURSO, D.F. - J. Am. Chem. Soc., 72: 677, 1950.
29. GAILLARD, B.D.E. - Nature 171: 1150, 1953.
30. MUKERJEE, H. & SRI RAN, J. - J. Chromatog., 14: 551, 1964.
31. HOUGH, J., JONES, J.K.N. & WADMAN, W.H. - J. Chem. Soc., 1702, 1950.
32. AVIGAD, G., ZELIKSON, R. & HESTRIN, S. - Biochem. J., 30: 57, 1951.
33. NORTHCOTE, D.H. - Biochem. J., 58: 353, 1954.
34. BOURNE, E.J., HUTSON, D.H. & WEIGEL, H. - Chem. Ind. (London): 1047, 1959; J. Chem. Soc., 4252, 1950.
35. TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. - Nature 166: 444, 1950.
36. ALBERSHEIM, P., NEVINS, D.J., ENGLISH, P.D. & KARR, A. - Carbohydrate Res., 5: 340, 1967.
37. FLEURY, P. & LANGE, J. - J. Pharm. Chim., 17: 107, 1933.
38. ANDERSON, D.M.W., GREENWOOD, C.T. & HIRST, E.L. - J. Chem. Soc., 225, 1955.
39. LAMBERT, M. & NEISH, A.C. - Can. J. Res. B., 23: 83, 1950.
40. BRIGGS, D.R., GARNER, E.F., MONTGOMERY, R. & SMITH, B. - Anal. Chem., 28: 1333, 1956.
41. VERHUE, Walter - De enzymatische vorming en afbraak van de vertakkigen van glycogen. (Tese de doutoramento) Katholieke Universiteit Leuven, Fakulteit der Wetenschappen, 1955.
42. ABDEL-AKHER, M., HAMILTON, J.K., MONTGOMERY, R. & SMITH, F. - J. Am. Chem. Soc., 74: 4970, 1952.
43. HAMILTON, J.K. & SMITH, F. - J. Am. Chem. Soc., 73: 5907, 1956.
44. AVIGAD, G., AMARAL, D., ASENSIO, C. & HORECKER, B.L. - J. Biol. Chem., 237: 2736, 1962.
45. DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. - Anal. Chem., 23: 350, 1956; Nature 163: 167, 1951.

46. DISCHE, Z. - J. Biol. Chem., 167: 139, 1947.
47. KABAT, E.A. & MAYER, M.M. - Experimental immunochemistry. 2. ed. Springfield, Ill. C.C. Thomas, 1964. p. 476.
48. ANTONOPOULOS, C.A. - Acta Chem. Scand., 16: 1521, 1962.
49. SCOTT, J.E. - Methods Biochem. Anal., 8: 145, 1960.
50. KUHN, R. & BIELIG, H.J. - Ber. 73B: 1080, 1940.
51. POWNEY, J. - Nature 152: 76, 1943.
52. JAGUES, L.B., MONKHOUSE, C. & STEWART, M. - J. Physiol. (London) 109: 41, 1949.
53. JONES, A.S. - Biochem. et Biophys. Acta, 10: 607, 1953.
54. TERAYAMA, H. - Polymer Sci., 8: 243, 1955.
55. SCOTT, J.E. - Chem. Ind. (London): 163, 1955.
56. STACEY, M. & BARKER, S.A. - in Biochemistry of Nitrogen (in Honor of Arturi Vir-  
tabed) Academ. Sci. Fennica "A"II Chemica 60: 262, 1955.
57. SAITO, S. - Kolloid-Z., 143: 66, 1955.
58. DUARTE, J. H., CORRÊA, J.B.C. & DMYTRACZENKO, A. - Ciência e Cultura  
(São Paulo) 19(2): 339, 1967.
59. WOLFROM, M.L., THOMPSON, A., O'NEILL, A.N. & GALKOWSKI, T.T. - J.  
Am. Chem. Soc., 74: 1062, 1952.